

Aus der Klinik für Frauenheilkunde
mit Poliklinik und Hebammenschule
der Universität Erlangen-Nürnberg
komm. Direktor: Professor Dr. med. H. Egger

Die Kryokonservierung von Mäuseembryonen mit dem automatisierten „Offenen System“ mit Selbstseeding

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Ernst Robert Siebzehnrübl
aus Passau

1984



Aus der Klinik für Frauenheilkunde
mit Poliklinik und Hebammenschule
der Universität Erlangen-Nürnberg
komm. Direktor: Professor Dr. med. H. Egger

Die Kryokonservierung von Mäuseembryonen mit dem automatisierten „Offenen System“ mit Selbstseeding

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Ernst Robert Siebzehnrübl
aus Passau

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

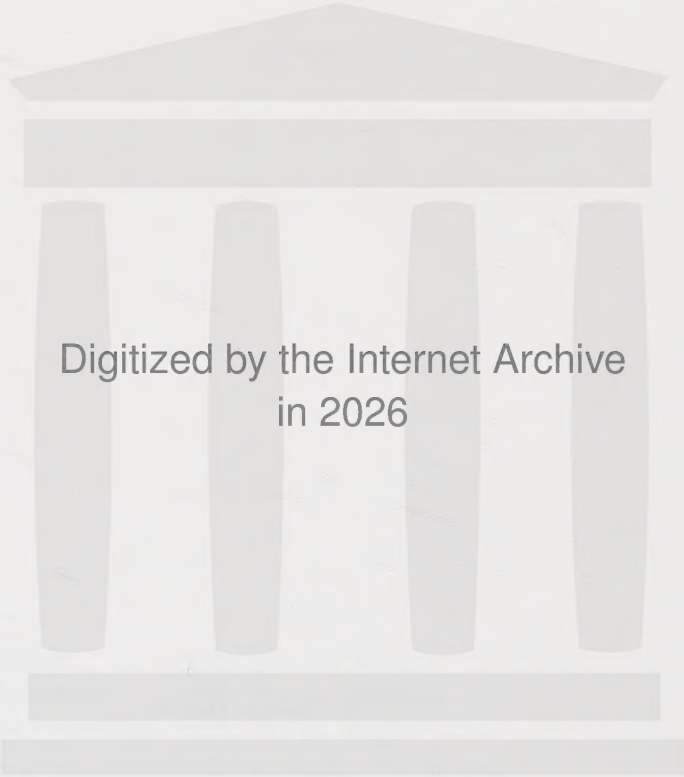
Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. S. Trotnow
Korreferent: Prof. Dr. H. Egger

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.1984

1. Einleitung	1
2. Die Bedeutung der Familie	2
3. Die Entwicklung der Familie	3
4. Die Aufgaben der Familie	4
5. Die Probleme der Familie	5
6. Die Förderung der Familie	6
7. Die Zukunft der Familie	7
8. Die Familie in der Gesellschaft	8
9. Die Familie und die Politik	9
10. Die Familie und die Wirtschaft	10
11. Die Familie und die Kultur	11
12. Die Familie und die Religion	12
13. Die Familie und die Wissenschaft	13
14. Die Familie und die Kunst	14
15. Die Familie und die Literatur	15
16. Die Familie und die Musik	16
17. Die Familie und die Sportarten	17
18. Die Familie und die Freizeitaktivitäten	18
19. Die Familie und die Gesundheit	19
20. Die Familie und die Umwelt	20
21. Die Familie und die Technologie	21
22. Die Familie und die Medien	22
23. Die Familie und die Mobilität	23
24. Die Familie und die Energie	24
25. Die Familie und die Wasserwirtschaft	25
26. Die Familie und die Luftwirtschaft	26
27. Die Familie und die Seefahrt	27
28. Die Familie und die Raumfahrt	28
29. Die Familie und die Astronomie	29
30. Die Familie und die Kosmologie	30
31. Die Familie und die Biologie	31
32. Die Familie und die Chemie	32
33. Die Familie und die Physik	33
34. Die Familie und die Mathematik	34
35. Die Familie und die Informatik	35
36. Die Familie und die Ingenieurwissenschaften	36
37. Die Familie und die Medizin	37
38. Die Familie und die Zahnmedizin	38
39. Die Familie und die Veterinärmedizin	39
40. Die Familie und die Landwirtschaft	40
41. Die Familie und die Fischerei	41
42. Die Familie und die Jägerei	42
43. Die Familie und die Forstwirtschaft	43
44. Die Familie und die Bergbauwirtschaft	44
45. Die Familie und die Textilwirtschaft	45
46. Die Familie und die Lederwirtschaft	46
47. Die Familie und die Holzwirtschaft	47
48. Die Familie und die Papierwirtschaft	48
49. Die Familie und die Glaswirtschaft	49
50. Die Familie und die Keramikwirtschaft	50
51. Die Familie und die Metallwirtschaft	51
52. Die Familie und die Kunststoffwirtschaft	52
53. Die Familie und die Lebensmittelwirtschaft	53
54. Die Familie und die Bekleidungsindustrie	54
55. Die Familie und die Modeindustrie	55
56. Die Familie und die Schmuckindustrie	56
57. Die Familie und die Uhrenindustrie	57
58. Die Familie und die optische Industrie	58
59. Die Familie und die elektronische Industrie	59
60. Die Familie und die Automobilindustrie	60
61. Die Familie und die Luftfahrtindustrie	61
62. Die Familie und die Raumfahrtindustrie	62
63. Die Familie und die Seefahrtsindustrie	63
64. Die Familie und die Raumfahrtindustrie	64
65. Die Familie und die Astronomieindustrie	65
66. Die Familie und die Kosmologieindustrie	66
67. Die Familie und die Biologieindustrie	67
68. Die Familie und die Chemieindustrie	68
69. Die Familie und die Physikindustrie	69
70. Die Familie und die Mathematikindustrie	70
71. Die Familie und die Informatikindustrie	71
72. Die Familie und die Ingenieurwissenschaftenindustrie	72
73. Die Familie und die Medizinindustrie	73
74. Die Familie und die Zahnmedizinindustrie	74
75. Die Familie und die Veterinärmedizinindustrie	75
76. Die Familie und die Landwirtschaftindustrie	76
77. Die Familie und die Fischereindustrie	77
78. Die Familie und die Jägereiindustrie	78
79. Die Familie und die Forstwirtschaftindustrie	79
80. Die Familie und die Bergbauwirtschaftindustrie	80
81. Die Familie und die Textilwirtschaftindustrie	81
82. Die Familie und die Lederwirtschaftindustrie	82
83. Die Familie und die Holzwirtschaftindustrie	83
84. Die Familie und die Papierwirtschaftindustrie	84
85. Die Familie und die Glaswirtschaftindustrie	85
86. Die Familie und die Keramikwirtschaftindustrie	86
87. Die Familie und die Metallwirtschaftindustrie	87
88. Die Familie und die Kunststoffwirtschaftindustrie	88
89. Die Familie und die Lebensmittelwirtschaftindustrie	89
90. Die Familie und die Bekleidungsindustrieindustrie	90
91. Die Familie und die Modeindustrieindustrie	91
92. Die Familie und die Schmuckindustrieindustrie	92
93. Die Familie und die Uhrenindustrieindustrie	93
94. Die Familie und die optische Industrieindustrie	94
95. Die Familie und die elektronische Industrieindustrie	95
96. Die Familie und die Automobilindustrieindustrie	96
97. Die Familie und die Luftfahrtindustrieindustrie	97
98. Die Familie und die Raumfahrtindustrieindustrie	98
99. Die Familie und die Seefahrtsindustrieindustrie	99
100. Die Familie und die Raumfahrtindustrieindustrie	100

Meiner Familie

1. Die Bedeutung der Familie	1
2. Die Entwicklung der Familie	2
3. Die Aufgaben der Familie	3
4. Die Probleme der Familie	4
5. Die Förderung der Familie	5
6. Die Zukunft der Familie	6
7. Die Familie in der Gesellschaft	7
8. Die Familie und die Politik	8
9. Die Familie und die Wirtschaft	9
10. Die Familie und die Kultur	10
11. Die Familie und die Religion	11
12. Die Familie und die Wissenschaft	12
13. Die Familie und die Kunst	13
14. Die Familie und die Literatur	14
15. Die Familie und die Musik	15
16. Die Familie und die Sportarten	16
17. Die Familie und die Freizeitaktivitäten	17
18. Die Familie und die Gesundheit	18
19. Die Familie und die Umwelt	19
20. Die Familie und die Technologie	20
21. Die Familie und die Medien	21
22. Die Familie und die Mobilität	22
23. Die Familie und die Energie	23
24. Die Familie und die Wasserwirtschaft	24
25. Die Familie und die Luftwirtschaft	25
26. Die Familie und die Seefahrt	26
27. Die Familie und die Raumfahrt	27
28. Die Familie und die Astronomie	28
29. Die Familie und die Kosmologie	29
30. Die Familie und die Biologie	30
31. Die Familie und die Chemie	31
32. Die Familie und die Physik	32
33. Die Familie und die Mathematik	33
34. Die Familie und die Informatik	34
35. Die Familie und die Ingenieurwissenschaften	35
36. Die Familie und die Medizin	36
37. Die Familie und die Zahnmedizin	37
38. Die Familie und die Veterinärmedizin	38
39. Die Familie und die Landwirtschaft	39
40. Die Familie und die Fischerei	40
41. Die Familie und die Jägerei	41
42. Die Familie und die Forstwirtschaft	42
43. Die Familie und die Bergbauwirtschaft	43
44. Die Familie und die Textilwirtschaft	44
45. Die Familie und die Lederwirtschaft	45
46. Die Familie und die Holzwirtschaft	46
47. Die Familie und die Papierwirtschaft	47
48. Die Familie und die Glaswirtschaft	48
49. Die Familie und die Keramikwirtschaft	49
50. Die Familie und die Metallwirtschaft	50
51. Die Familie und die Kunststoffwirtschaft	51
52. Die Familie und die Lebensmittelwirtschaft	52
53. Die Familie und die Bekleidungsindustrie	53
54. Die Familie und die Modeindustrie	54
55. Die Familie und die Schmuckindustrie	55
56. Die Familie und die Uhrenindustrie	56
57. Die Familie und die optische Industrie	57
58. Die Familie und die elektronische Industrie	58
59. Die Familie und die Automobilindustrie	59
60. Die Familie und die Luftfahrtindustrie	60
61. Die Familie und die Raumfahrtindustrie	61
62. Die Familie und die Seefahrtsindustrie	62
63. Die Familie und die Raumfahrtindustrie	63
64. Die Familie und die Astronomieindustrie	64
65. Die Familie und die Kosmologieindustrie	65
66. Die Familie und die Biologieindustrie	66
67. Die Familie und die Chemieindustrie	67
68. Die Familie und die Physikindustrie	68
69. Die Familie und die Mathematikindustrie	69
70. Die Familie und die Informatikindustrie	70
71. Die Familie und die Ingenieurwissenschaftenindustrie	71
72. Die Familie und die Medizinindustrie	72
73. Die Familie und die Zahnmedizinindustrie	73
74. Die Familie und die Veterinärmedizinindustrie	74
75. Die Familie und die Landwirtschaftindustrie	75
76. Die Familie und die Fischereindustrie	76
77. Die Familie und die Jägereiindustrie	77
78. Die Familie und die Forstwirtschaftindustrie	78
79. Die Familie und die Bergbauwirtschaftindustrie	79
80. Die Familie und die Textilwirtschaftindustrie	80
81. Die Familie und die Lederwirtschaftindustrie	81
82. Die Familie und die Holzwirtschaftindustrie	82
83. Die Familie und die Papierwirtschaftindustrie	83
84. Die Familie und die Glaswirtschaftindustrie	84
85. Die Familie und die Keramikwirtschaftindustrie	85
86. Die Familie und die Metallwirtschaftindustrie	86
87. Die Familie und die Kunststoffwirtschaftindustrie	87
88. Die Familie und die Lebensmittelwirtschaftindustrie	88
89. Die Familie und die Bekleidungsindustrieindustrie	89
90. Die Familie und die Modeindustrieindustrie	90
91. Die Familie und die Schmuckindustrieindustrie	91
92. Die Familie und die Uhrenindustrieindustrie	92
93. Die Familie und die optische Industrieindustrie	93
94. Die Familie und die elektronische Industrieindustrie	94
95. Die Familie und die Automobilindustrieindustrie	95
96. Die Familie und die Luftfahrtindustrieindustrie	96
97. Die Familie und die Raumfahrtindustrieindustrie	97
98. Die Familie und die Seefahrtsindustrieindustrie	98
99. Die Familie und die Raumfahrtindustrieindustrie	99
100. Die Familie und die Astronomieindustrieindustrie	100



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546206_0027

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Die Entwicklung der Kryokonservierung.	3
2.2	Die Gefrierverfahren	5
2.2.1	Kryoprotektiva	5
2.2.2	Kühlprofile.	7
2.2.3	Die Auslösung der Kristallisation.	10
2.2.4	Der Auftauvorgang.	11
2.2.5	Die Beurteilung der Embryonalqualität.	11
2.2.6	Die Gefriertechnik	12
2.2.6.1	Kühlbäder.	13
2.2.6.2	Kammergefriergeräte.	14
2.2.6.3	MacDonald Gefriergerät	16
2.2.6.4	Das "Offene System" - "Modell Neustadt/Aisch".	17
2.2.6.5	Das automatisierte "Offene System"	18
2.3	Untersuchungen über die Bedeutung des Seeding.	20
2.4	Der Kristallisationsprozeß	21
2.4.1	Aggregatzustände und Phasen.	21
2.4.2	Die Veränderungen im Medium bei Kühlung und Kristallisation.	25
2.4.3	Die Veränderungen am lebenden Gewebe während des Tiefgefriervorganges	26
2.5	Der Schädigungsmechanismus beim Tiefgefrieren.	27
3	Material und allgemeine Methodik	33
3.1	Tiermaterial	33
3.2	Medien und Kulturbedingungen	34
3.3	Der Ablauf der Tiefgefrierversuche	35
3.3.1	Die Embryogewinnung.	35

3.3.2	Die DMSO - Reihe	36
3.3.3	Das Einbringen der Embryonen in die Straws	36
3.3.4	Der Gefrierprozeß.	36
3.3.5	Das Auftauen	37
3.3.6	Die Kultivierung	37
3.3.7	Der Transfer	38
3.3.8	Die Explorative Laparatomie bei den "Ammen".	38
3.4	Die Beurteilung der Embryonen.	38
3.5	Physikalische Untersuchungen	39
3.6	Die Gefriereinrichtung "CTE 8000"	40
3.6.1	Temperaturverteilung im Kühlbehälterschacht.	40
3.6.2	Beschreibung der Bauteile.	42
3.6.2.1	Hebevorrichtung und Kühlbehälter	43
3.6.2.2	Elektronische Regeleinheit	44
3.6.2.3	Microcomputer.	45
3.6.2.4	Der Reglerentwurf.	46
3.6.3	Die Versuchsvorbereitung	47
3.7	Der "Erlanger Straw"	48
3.7.1	Bauprinzip und Modifikationen.	48
3.7.2	Selbsttätiges Seeding.	50
3.7.3	Füllung der "Erlanger Straws".	53
3.7.4	Leerung des Straws	53
4	Untersuchung des Kristallisationsvorganges und der Zuverlässigkeit der CTE 8000	54
4.1	Vorversuche.	54
4.1.1	Temperatur der Pinzettenspitze beim Kontaktseeding .54	
4.1.1.1	Versuchsaufbau	54
4.1.1.2	Ergebnisse	55
4.2	Der Selbstseedingprozeß im Vergleich zum Kontaktseeding	59
4.2.1	Der Selbstseedingvorgang in Abhängigkeit von seiner Dauer	60
4.2.2	Die Temperaturveränderungen im Medium während der Kristallisation.	61

4.2.3	Die Eisbildung im Medium	.62
4.3	Der Einfluß verschiedener Modifikationen des "Erlanger Straws" auf die Kristallisation.	.64
4.3.1	Einfluß verschiedener Embryocontainer.	.64
4.3.2	Einfluß der Anwesenheit von Embryonen im Straw . . .	.65
4.3.3	Beeinflussung der Kristallisation durch die Meßfühler.	.65
4.4	Die Bedeutung eines Eingriffes in die Regelung für den Seedingvorgang	.66
4.5	Die Wirkung verschiedener Kühlraten.	.67
4.6	Der Beginn der Kristallisation	.67
4.7	Die Kristallisationsdauer.	.69
4.8	Die Zuverlässigkeit des Seedings	.71
4.9	Die Reproduzierbarkeit der Gefriervorgänge	.71
5	Die Kryokonservierung von Mäuseembryonen.	.75
5.1	Vorversuche.	.75
5.2	Erste Versuchsreihe Vergleich zwischen Kontakt- und Selbstseeding.	.76
5.2.1	Der spezielle Versuchsaufbau	.76
5.2.2	Ergebnisse	.77
5.2.2.1	Die Wiederfindungsrate	.78
5.2.2.2	Der Anteil morphologisch intakter Embryonen.	.79
5.2.2.3	Die Weiterentwicklung in vitro	.80
5.2.2.4	Die Transferergebnisse	.81
5.3	Zweite Versuchsreihe Vergleich verschiedener Kristallisationszeiten beim Selbstseeding.	.82
5.3.1	Der spezielle Versuchsaufbau	.82
5.3.2	Ergebnisse	.85
5.5.1	Die einzelnen Versuchsreihen	.97
5.5.1.1	1. Versuchsreihe - Kontaktseeding.	.98
5.5.1.2	1. Versuchsreihe - Selbstseeding	.99
5.5.1.3	2. Versuchsreihe - 2 A	100
5.5.1.4	2. Versuchsreihe - 2 B	101
5.5.1.5	2. Versuchsreihe - 2 C	102
5.5.2	Gegenüberstellung beider Versuchsreihen.	103
5.5.2.1	Die Wiederfindungsrate	103

5.5.2.2	Der Anteil morphologisch intakter Embryonen. . . .	104
5.5.2.3	Die in vitro Entwicklung	105
5.5.2.4	Die Transferergebnisse	106
6	Diskussion	107
7	Zusammenfassung.	114
8	Anhang	116
8.4.3	Verfahren zur Untersuchung des Kristallisations- prozesses.	116
8.4.3.1	Der Einfluß der verwendeten Straws	117
8.4.3.2	Einfluß der Anwesenheit von Embryonen im Straw . .	118
8.4.3.3	Einfluß des Meßfühlers	121
8.4.4	Eingriff in die Regelung	122
8.4.5	Die Wirkung verschiedener Kühlraten.	123
8.5	Kryokonservierung von Mäuseembryonen	125
8.5.2	Erste Versuchsreihe.	125
8.5.2.2.1	Wiederfindungsrate	125
8.5.2.2.2	Anteil morphologisch intakter Embryonen. . . .	125
8.5.2.2.3	Die kulturelle Weiterentwicklung	126
8.5.2.2.4	Die Transferergebnisse	126
8.5.3	Zweite Versuchsreihe	127
8.5.3.2.1	Wiederfindungsrate	127
8.5.3.2.2	Anteil morphologisch intakter Embryonen. . . .	127
8.5.3.2.3	Die in vitro Entwicklung	127
8.5.3.2.4	Die Transferergebnisse	128
8.5.4	Gegenüberstellung verschiedener Embryonalstadien	128
8.5.4.1	Erste Versuchsreihe.	128
8.5.4.2	Zweite Versuchsreihe	131
8.5.4.3	Gegenüberstellung der 1. und 2. Versuchsreihe. .	134
9	Literaturverzeichnis	136

1 Einleitung

Während in der Veterinärmedizin die Kryokonservierung von Säugerembryonen schon fast als praxisreif betrachtet wird (72,74,125,167), sind die erreichten Überlebensraten für den Bereich der Humanmedizin schon deswegen unbefriedigend, weil die verwendeten Präimplantationsembryonen unter anderem ja auch als Modelle komplexer Gewebe dienen sollen (15,108,217), deren Tieftemperaturlagerung über lange Zeit für viele Bereiche der Medizin einen entscheidenden Vorteil darstellen würde. Als Beispiel seien hier nur die Möglichkeiten genannt, Langerhans Inseln einzufrieren, zu lagern und einem HLA-kompatiblen Diabetiker zu transplantieren (31,32,32,173), bzw. Versuchstierstämme über lange Zeit genetisch stabil zu erhalten (11,87).

Durch viele Untersucher konnte gezeigt werden, daß nicht die tiefe Temperatur selbst (101,129,130,131) oder die Dauer der Lagerung in flüssigem Stickstoff für die beobachteten Schäden an den Embryonen verantwortlich ist (121,131,215,225). Diese entstehen vielmehr während des Kühl- oder Auftauvorganges (100,102,112,127,128,136,139,175,224), wofür auch spricht, daß bisher noch keinerlei Chromosomenschäden nach der Kryokonservierung nachgewiesen werden konnten (8,9,16,89,95,121).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen verschieden ablaufender Kristallisationsvorgänge während der Kryokonservierung auf die Überlebensraten von Mäuseembryonen. Dabei wurde von zwei Nullhypothesen ausgegangen.

Erstens : das übliche Kontaktseeding und unser neuentwickeltes Verfahren zur Auslösung der Kristallisation beeinflussen die Qualität der Embryonen nicht unterschiedlich.

Zweitens: Die Qualität der Embryonen wird auch nicht durch den verschieden langen Ablauf des Selbstseedingverfahrens beeinflusst.



Nebenbei sollten die Kristallisationsprozesse und die Zuverlässigkeit des verwendeten Systemes untersucht werden. Aufgrund der fehlenden Kenntnisse in diesen Bereichen konnte nicht von Hypothese und Gegenhypothese ausgegangen werden. Um Hinweise zu erhalten, welche Folgeuntersuchungen anzustreben sind, wurde dennoch eine Reihe statistischer Testverfahren angewendet, die zwar keine 'signifikanten' Unterschiede aufzeigen, aber doch Hinweise geben können, wo Einflüsse der untersuchten Variablen zu vermuten sind.

Diese Untersuchungen waren möglich geworden, da das in Erlangen und Neustadt/Aisch entwickelte "Offene System" am Institut für Regelungstechnik der Universität Erlangen soweit verbessert wurde, daß die Regelung auch kleine Temperaturabweichungen vom Sollwert verhindern kann; zudem erlaubt ein neues Verfahren eine spontane Kristallisation und macht ein artifizielles "Seeding" überflüssig.

2 Schrifttum

2.1 Die Entwicklung der Kryokonservierung

Mitte des letzten Jahrhunderts erschienen die ersten Berichte über Beobachtungen beim Gefrieren lebenden Gewebes (172). Einen wichtigen Impuls erhielt diese Forschungsrichtung aber erst mit der Entdeckung von POLGE, daß Glycerol die Motilität tiefgefrorener Spermatozoen deutlich verbessert (169). Im selben Jahr begann die Kryokonservierung von Blutbestandteilen (118). Schon kurze Zeit später veröffentlichte CHANG erste Untersuchungen über die Auswirkungen tiefer Temperaturen auf Säugerembryonen (39,40,41,42,43,44). In den fünfziger Jahren erschienen die ersten Veröffentlichungen, die sich mit der Ursache der Schäden befaßten, die bei der Tieftemperaturkonservierung beobachtet werden konnten. 1963 konnte MAZUR seine bis heute anerkannte Theorie zu diesen Vorgängen publizieren (127). Diese Erkenntnisse waren an Einzellern (Bakterien und Hefen) sowie an Erythrozyten erarbeitet worden.

1971 berichtete WHITTINGHAM erstmals über die Tiefgefrierkonservierung von Mäuseembryonen (209) und 1972 gelang die Kryokonservierung und Lagerung in flüssigem Stickstoff fast gleichzeitig WHITTINGHAM und WILMUT (220,233,234). Seither konnten Embryonen und Sperma fast aller Labor- und Nutztierarten erfolgreich tiefgefroren werden, wobei die erzielten Überlebensraten jedoch recht unterschiedlich sind (24,78,108,170,171,235,236).

Auch die in vitro-Fertilisation ist nach dem Tiefgefrieren bei Oocyten von Maus, Ratte und Hamster möglich (82,83,198, 214). Während in der ersten Phase der Entwicklung dieser Forschungsrichtung das Interesse ganz auf die Komposition möglichst idealer Medien zur Embryokultivierung gerichtet war (22,34,35, 36,37,110,112,165,204,205,206,208,219), untersuchte man in den

Jahren bis 1977 intensiv die Auswirkungen der Gefrierschutzmittel auf die Überlebensraten der Embryonen. (7, 14, 19, 20, 63, 90, 100, 101, 103, 104, 105, 133, 140, 146, 153, 156, 168, 177, 202, 206, 227) Seit 1976 begann man sich auch für den Kristallisationsprozeß im Medium und seine Induktion (Seeding), sowie für die Eisbildung in den Zellen zu interessieren und entwickelte etwa zur selben Zeit ein sogenanntes "Zwei-Stufen-Einfrierverfahren", das die Kryokonservierung wesentlich beschleunigte und vereinfachte (25, 62, 96, 106, 131, 135, 192, 226). Erst in der allerletzten Zeit ist die Entwicklung von Verfahren gelungen, die ein sogenanntes "Selbstseeding" ermöglichen, also während des Gefriervorganges selbsttätig den Kristallisationsprozeß in Gang bringen. Ebenfalls erst in der jüngsten Vergangenheit wurde ein neues, noch weiter vereinfachtes Verfahren vorgestellt, das den Gefriervorgang durch Einsatz von nur drei Kühlbädern noch unkomplizierter als bisher machen soll (28, 67, 217, 238).

Während also ein Teil der Forschungsaktivität sich darauf konzentriert, die Technik der Kryokonservierung immer weiter zu vereinfachen und Methoden für den praktischen Einsatz in der Veterinärmedizin zu entwickeln, versuchen andere Forscher, die physikalischen, chemischen und biochemischen Vorgänge aufzuhehlen, die beim Kühl- und Auftauvorgang ablaufen. Denn obwohl schon seit 20 Jahren detaillierte mathematische Modelle dieser Vorgänge vorliegen, ist man in einigen Bereichen noch nicht über das Stadium der Spekulation hinausgekommen. Allgemeingültige Aussagen zu erhalten wird insbesondere dadurch erschwert, daß sich die physiologischen Parameter der Präimplantationsembryonen, wie zum Beispiel ihre Membranpermeabilität und ihr Metabolismus, dynamisch mit ihrer Entwicklung ändern (22, 108), so daß zum Beispiel Permeabilitätskoeffizienten für ein bestimmtes Gefrierschutzmittel nur für das untersuchte Stadium der betrachteten Spezies gelten und jede Extrapolation mit großen Unsicherheiten belastet ist. So konnte JACKOWSKI 1977 zeigen, daß sich die Oocyten der Maus in Bezug auf ihre Glycerolpermeabilität ganz anders verhalten, als Zygoten der selben Spezies (79, 81).

2.2 Gefrierverfahren

2.2.1 Kryoprotektiva

Nach dem Glycerol, dessen Schutzwirkung bei der Kühlung lebender Gewebe zuerst entdeckt wurde (169,190,191), sind noch eine ganze Reihe weiterer Gefrierschutzmittel gefunden worden. So verwendete man Serumproteine, Dextrane, hochmolekulare Zucker und niedermolekulare Stoffe verschiedener Substanzklassen. Bedeutung davon erlangten:

- * Glycerol
- * Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)
- * Sucrose
- * Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Wegen seiner toxischen Eigenschaften wird das PVP heute praktisch nicht mehr verwendet (95,154), während Sucrose nur noch als Hilfssubstanz beim Auftauen bzw. Ausverdünnen benützt wird (85,125,145).

Der Streit über den Wirkungsmechanismus der Kryoprotektiva ist alt und immer noch nicht entschieden. Zunächst galt, daß ein Schutz nur dann besteht, wenn das Gefrierschutzmittel in die Zelle diffundieren kann, um einen osmotischen Schock oder eine mechanische Schädigung der Zelle durch intrazelluläres Gefrieren zu verhindern (49,114,116,188,199). Als dann erkannt wurde, daß PVP gar nicht in die Zelle eindringen kann, teilte man die Kryoprotektiva in zwei Gruppen ein (129,131,133,136, 146,186):

1. Nicht penetrierende Gefrierschutzmittel, die den Anteil des Wassers erhöhen, das bei einer bestimmten Temperatur flüssig vorliegt. Dadurch wird die Konzentration der Elektrolyte in der zur Verfügung stehenden Flüssigkeit relativ vermindert und die Zelle kann osmotisch besser reagieren (136,149,155).

2. Penetrierende Gefrierschutzmittel, die wirken sollten, indem sie den intrazellulären osmotischen Druck herauf und damit den transmembranösen Druckgradienten herabsetzen (15,80,139).

Als Beobachtungen dafür zu sprechen schienen, daß Glycerol und DMSO gar nicht in die Zelle einzudringen brauchen, um Schäden durch den Gefriervorgang zu verhindern (95,98,105,142,143,144), wurde diese Aufteilung wieder fallen gelassen und die Kryoprotektion mit recht komplexen Vorgängen an der Zellmembran und kolligativen Wirkungen im Medium zu erklären versucht (73,95,98,131).

1977 bewiesen JACKOWSKI's Versuche mit radioaktiv markiertem Glycerol dann, daß dieses Gefrierschutzmittel bei 0 °C in die Mäuseeizellen eindringt, wenn auch sehr langsam (79,80,81). Da sie auch zeigen konnte, daß eine Berechnung der Menge des eingedrungenen Glyceroles auch über die Messung der Volumenänderung der Zelle möglich ist, konnten andere Autoren sich bei der Bestimmung der Penetrationsraten der Gefrierschutzmittel auf relativ einfache Volumenbestimmungen mittels Planimetrie beschränken (98,99,106,107). So zeigte HEISE, daß auch DMSO bei 0 °C penetriert (74).

Die altbewährte Einteilung der Gefrierschutzmittel in penetrierende und nicht penetrierende ist damit wieder aktuell geworden, wenn sie auch an Bedeutung verloren hat, da nahezu nur mehr DMSO und Glycerol zur Konservierung von Embryonen verwendet werden, wobei von Zeit zu Zeit das eine oder das andere bevorzugt wird (7,66,93).

Die Natur der Schutzwirkung ist immer noch nicht ausreichend geklärt. Während LEIBO, MAZUR und MERYMAN von einer rein kolligativen Wirkung ausgehen, die zu einer Herabsetzung der Elektrolytkonzentration im Medium führen soll und es für wichtig halten, daß ein großer Anteil ungefrorenen Wassers den "osmotischen Streß" der Zellen möglichst klein hält (98,108, 136, 152), wird als weiterer Mechanismus noch die Stabilisierung der Zellmembranen diskutiert, wodurch eine Entstehung von Lücken

verhindert wird, die die freie Passage von niedermolekularen Stoffen, wie Glycerol, DMSO und Ionen ermöglichen (17, 73, 151, 163).

Recht umfangreiche Untersuchungen sind darüber angestellt worden, wie die Zugabe und die Ausverdünnung der Gefrierschutzmittel zu erfolgen hat. Standardmäßig wird dabei in den letzten Jahren bei der Kryokonservierung von Embryonen folgendes Verfahren eingesetzt:

Die Zugabe erfolgt in drei bis fünf Schritten bei 37 °C, seltener bei 0 ° oder 20 °C, die Ausverdünnung ebenfalls in mindestens drei, oft bis zu sieben Schritten bei den selben Temperaturen (85, 133, 134, 136, 152, 194, 213, 215, 228). Alle Versuche, diesen Vorgang abzukürzen oder die Embryonen sogar in der Gefrierschutzlösung zu transferieren, sind fehlgeschlagen, da wohl der osmotische Gradient zwischen der Schutzlösung und damit den Embryonen und dem intrauterinen Milieu, der etwa 1.3 bis 3.0 Osmol – je nach der Konzentration des Kryoprotektivums – beträgt, offensichtlich zu groß ist (15, 92, 100, 125, 184).

2.2.2 Kühlprofile

Unter dem Profil eines Einfriervorganges sei hier das Temperatur-Zeit-Diagramm verstanden. Ein solches Diagramm kann erstellt werden, indem man die aktuelle Temperatur eines Probengefäßes mit einem Meßfühler, meist ein Kupfer – Konstantan – Thermoelement, registriert und auf einem geeichten Schreiber gegen die Zeit darstellt. Nun hängt es entscheidend von der gewählten Versuchsanordnung ab, ob und in welchem Umfang die so erhaltenen Werte zuverlässig sind. Im Abschnitt 2.2.6 wird das Problem der Reabilität der verschiedenen Gefrierverfahren noch näher besprochen.

Im Anfang der Kryokonservierung von Embryonen wurden DEWAR-Gefäße bzw. Bäder verschiedener Temperatur zum Einfrieren verwendet. Die Kühlraten, ausgedrückt in $\text{grad. Celsius pro Minute}$ oder pro Sekunde , wurden damals errechnet und zwar für die Spanne zwischen -10°C und -80°C , da in diesem Bereich ein einigermaßen linearer Temperaturverlauf angenommen wurde (12, 95, 137, 220).

Diesen Rechengrößen wurden später zwar Meßwerte zur Seite gestellt, aber noch 1978 hielt es LEIBO für ausreichend, den Gefriervorgang mit einem Thermometer zu überwachen (108). Es ist wohl offensichtlich, daß die so erhaltenen Diagramme nur sehr ungenaue Aussagen über den wirklichen Temperaturverlauf zu liefern vermögen. Trotzdem seien im folgenden einige Temperatur-Zeit-Verläufe wiedergegeben.

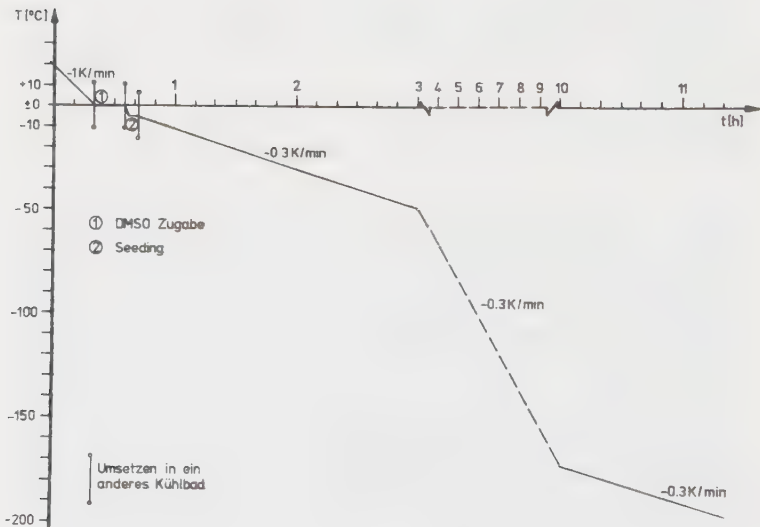


Abb. 2.2.2.1 langsamer Einfriervorgang nach WHITTINGHAM 1972

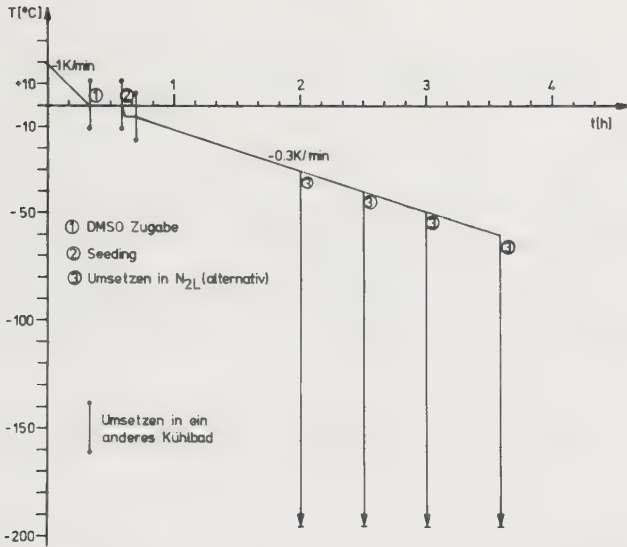


Abb. 2.2.2.2 Zwei-Stufen-Gefrierivorgang nach WHITTINGHAM 1979

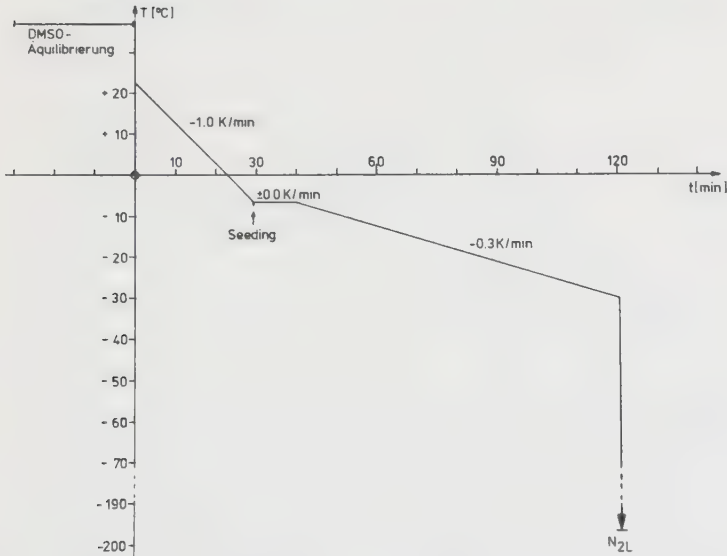


Abb. 2.2.2.3 Das in Deutschland übliche "Standard-Gefrierprofil" für Mäuseembryonen, nach 2,3,72,167

2.2.3 Die Auslösung der Kristallisation

Das Auslösen der Kristallisation (Seeding) ist notwendig, da es sonst zur Unterkühlung (Supercooling) des Mediums bis auf -21°C kommen kann. Die dann plötzlich einsetzende Kristallisation schädigt die Embryonen (89,103,104,128,129,241). Um ein Supercooling zu vermeiden, werden verschiedene Methoden angewendet:

- * Nach Zugabe des Gefrierschutzmittels und Äquilibrierung bei 0°C werden die Embryocontainer in ein Bad von -6 bis -7°C gebracht. Nach fünf bis zehn Minuten wird ein kleiner Mediumkristall oder ein Stückchen Trockeneis zugefügt, das als Kristallisationskeim dient (105,108,213,244).
- * Im selben Bad kann die Kristallisation durch Kontaktseeding ausgelöst werden. Dazu wird die Oberfläche des Embryobehälters mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Pinzette berührt (66,74,228,229).
- * Manche Kammergefriergeräte bieten die Möglichkeit, durch einen programmierten Kältestoß (union carbide), durch Berührung der Pailletten mit einem stickstoffdurchströmten Metallröhrchen (Keltorr) oder durch an einer Seite der Embryobehälter, die in einem Rohr stecken, vorbeiströmenden Stickstoffdampf (Planer) die Kristallisation selbsttätig auslösen zu lassen.
- * Beim "Offenen System" erfolgt das Seeding normalerweise durch Berührung mit einer vorgekühlten Pinzette (2,3,4,77). POKORNY hat eine Methode entwickelt, die auch im handgesteuerten "Offenen System" eine Art Selbstseeding ermöglicht, indem er die Straws senkrecht in den Schacht einbrachte, so daß sich am unteren Ende spontan Kristalle bilden können, die dann in das Mediumkompartiment vorwachsen, in dem sich die Embryonen befinden (167).

2.2.4 Der Auftauvorgang

Je nach der verwendeten Kühlgeschwindigkeit erfolgt das Auftauen mehr oder weniger schnell, jedoch immer schneller als das Einfrieren. Nach allgemeiner Ansicht bedarf es hoher Auftaugeschwindigkeiten, wenn schnell eingefroren wurde, während kleine Kühlraten auch langsames Auftauen erfordern. Unter schnellem Einfrieren werden dabei Kühlgeschwindigkeiten über -1 K/min und alle Verfahren verstanden, bei denen das Umsetzen in flüssigen Stickstoff oberhalb von $-50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte (108,217). Die Auftauraten liegen dabei zwischen $+250$ und $+1000 \text{ K/min}$, wobei allerdings anzumerken ist, daß das Auftauen bei diesen Verfahren meist im Wasserbad erfolgt und die Auftaurate aus den mehr oder weniger genau bestimmten Zeiten bis zum Schmelzen des Eises errechnet wird. Das langsame Auftauen, hier liegen die Geschwindigkeiten um die $+20 \text{ K/min}$, erfolgt entweder programmgesteuert mit den verwendeten Gefriergeräten oder, indem man die Embryobehälter durch verschieden temperierte Bäder führt (66,108,125,239). Wie schon dargestellt, wird anschließend immer das Gefrierschutzmittel ausgewaschen.

2.2.5 Die Beurteilung der Embryoqualität

Um unterscheiden zu können, welche Auswirkungen der Gefriervorgang auf die ihm unterworfenen Zellen hat, muß deren Lebensfähigkeit überprüft werden. Als erster Schritt wird dazu direkt nach dem Auswaschen des Kryoprotektivums unter dem Stereo- oder seltener unter dem Umkehrmikroskop beurteilt, ob die Embryonen verändert aussehen, bzw. welcher Anteil morphologisch intakt erscheint (30,53,57,123,185,196,228). Die meisten Untersucher sind sich aber über die mangelnde Validität dieser Methode im Klaren und schließen eine *in vitro*-Kultivierung mit folgender

Beurteilung der Fortentwicklungsfähigkeit und/oder einen Transfer der Embryonen in Empfängertiere an und beurteilen die Implantationsrate und gelegentlich die Anzahl der lebend geborenen Jungen.

Die bei anderen lebenden Geweben üblichen biochemischen Untersuchungen zur Beurteilung der Lebensfähigkeit der Zellen, sind bei der Arbeit mit Embryonen nicht notwendig und auch nicht sinnvoll, da sie einen Transfer nahezu unmöglich machen und damit das eigentliche Endziel, nämlich die Produktion lebender Nachkommen vereiteln (22,160,180,181). Eine Ausnahme stellt der von JACKOWSKI 1977 vorgestellte FDA-Test dar, der mittels 3'6'-Fluorescein-Diacetat eine genaue und relativ einfache Beurteilung der Lebensfähigkeit der Embryonen zuläßt. (79,80,81, 107). Dieser Test ist sehr ausführlich bei NIEMANN dargestellt, wo auch die Literatur zur Frage der Beurteilung der Embryonenqualität umfassend referiert wird (160).

Werden jedoch nur Embryonen höchster Qualität eingefroren und danach nur solche weiteruntersucht, die den Gefriervorgang unverändert überstanden haben, so ist ein solcher Test nicht notwendig (161,215,216).

2.2.6 Die Gefriertechnik

Während die ersten Untersuchungen über das Temperaturverhalten des lebenden Gewebes unter nahezu unkontrollierten Bedingungen erfolgten (189,190,191), gelang die Kryokonservierung von Säugerembryonen erst, als man dazu überging, diese in einem kleinen Volumen Medium in großvolumigen Bädern zu kühlen, die relativ temperaturstabil waren. Heute sind vor allem in der Veterinärmedizin Bestrebungen im Gange, die Verfahren soweit zu vereinfachen, daß ihr Einsatz in der Praxis möglich wird. Daraus resultierte die Entwicklung programmgesteuerter Kammergefriergeräte und verkürzter Einfrierverfahren (64,71,72,124, 228). Die verschiedenen Systeme sollen nun kurz vorgestellt werden.

2.2.6.1 Kühlbäder

Die Embryonen werden in offenen oder verschließbaren Röhrchen unterschiedlichen Volumens aus Glas oder Kunststoff durch verschieden temperierte Bäder geschleust. Das Seeding erfolgt durch Einbringen eines Kristalles (Medium oder Trockeneis) oder durch Berührung mit einer vorgekühlten Pinzette. Eine Variante dieses Verfahrens stellt die Verwendung verschieden isolierter DEWAR-Gefäße dar, durch die die Kühlraten variiert und der Gefrierprozeß verlängert werden kann, indem man versilberte oder evakuierte Gefäße verschiedenen Volumens wählt (15,18,85,105, 142,155,156,209,220).

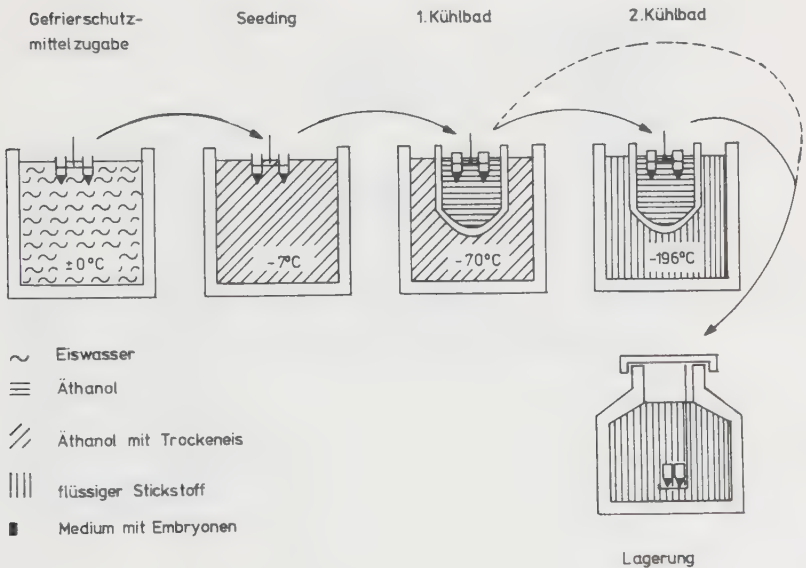


Abb. 2.2.6.1 Schema eines Einfriervorganges mit DEWAR-Gefäßen

Die Vorteile des Systemes sind der geringe Preis und die Unempfindlichkeit gegen technische Störungen, die Nachteile sind gerade durch diese Einfachheit bestimmt. So stellt es hohe Ansprüche an die Erfahrung des Experimentators, erlaubt keine linearen Temperaturverläufe und ist sehr zeitaufwendig, weil nicht automatisierbar (2,52,193).

2.2.6.2 Die Kammergefriergeräte

Um den Nachteilen der oben beschriebenen Methode zu entgehen, wurde eine ganze Reihe von Kammergefriergeräten entwickelt, die alle mehr oder weniger nach dem selben Prinzip arbeiten.

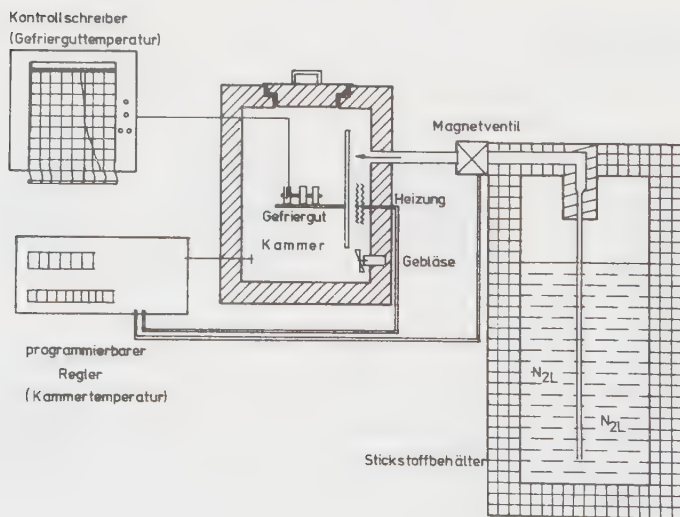


Abb. 2.2.6.2 Schema eines Kammergefriergerätes

Der Meßfühler registriert die Kammertemperatur und diese Meßwerte benützt die Regelung, um die Kammer durch Zufuhr von Stickstoffdampf zu kühlen bzw. durch Beheizung zu erwärmen. Die beabsichtigten Temperaturverläufe können vor Versuchsbeginn festgelegt werden, der Gefrierprozeß läuft automatisch ab, sobald das Seeding vorgenommen wurde. Einige neue Geräte bieten sogar Seedingvorrichtungen an, die diesen Vorgang bei einer bestimmten Temperatur in Gang bringen, ohne daß die Kammer geöffnet zu werden braucht. Dem Vorteil, automatisiert einfrieren zu können, stehen eine Reihe von Nachteilen gegenüber.

- * die Geräte sind sehr teuer.
- * da nur die Kammertemperatur geregelt wird, sind die erreichten Temperaturverläufe nicht ausreichend standardisierbar.
- * es kommt zu erheblichen Schwankungen im Temperaturprofil, da das Seeding (meist) von Hand vorgenommen und zur Überprüfung der vollständigen Kristallisation in jedem Falle die Kammer geöffnet werden muß.
- * Störungen des Temperaturverlaufes kommen auch durch das Einblasen von Stickstoffdampf in die Kammer zustande
- * dadurch steigt, wie HÜNLICH zeigen konnte, die Kühlrate kurzzeitig stark an, was wegen der starken Dämpfung der verwendeten Schreiber nicht einmal registriert werden kann (71,77,193).

2.2.6.3 MacDonald Gefriergerät

Ausgehend von der bei der Spermakonservierung schon lange üblichen Methode des Einfrierens im Stickstoffdampf, wurde von FORGRAVE et al. 1977 ein System vorgestellt, das dieses Verfahren auch für Embryonen ermöglichen sollte. Die in Plastikröhrchen (Straws) verpackten Eizellen wurden dabei mit einem "Schnurauzug" senkrecht in den Stickstoffbehälter hinabgelassen oder aus diesem heraufgeholt. Als Antrieb des "Aufzuges" diente ein Kymograph. Das Seeding erfolgte vor dem eigentlichen Einfrierprozeß in einem -7°C kalten Bad.

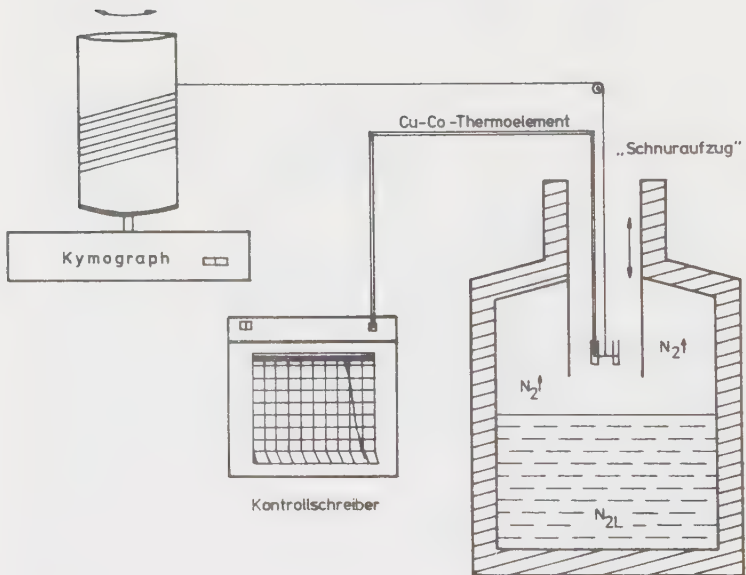


Abb. 2.2.6.3 MacDonald Gefriergerät (vereinfachtes Schema nach FORGRAVE et al. 1977)

Dieses System ist recht billig und vermeidet das Umsetzen der Embryocontainer, da diese nach Abschluß des Gefriervorganges direkt in dem Behälter verbleiben können. Allerdings erfordert es vor jedem Versuch eine lange Vorbereitungszeit, ist nicht automatisiert, verbraucht sehr viel Stickstoff und die Anpassung der Absenkgeschwindigkeit an die erstrebte Kühlgeschwindigkeit muß als Reaktion auf die vom Schreiber angezeigte aktuelle Kühlrate erfolgen (64).

2.2.6.4 Das "offene System" - Modell Neustadt/Aisch

Aus der Zusammenarbeit zwischen dem Besamungsverein Neustadt/A. und der Universitäts Frauenklinik Erlangen entstand ein Gefriersystem, das ebenfalls auf dem Prinzip des Einfrierens im Stickstoffdampf basiert (67,193,194). Da dies Gefriergerät bei HÜNLICH (77) und POKORNY (167) ausführlich beschrieben ist, sollen hier nur Vor- und Nachteile dargestellt werden. Das Gerät ist in Bau und Unterhalt sehr billig, da es keine aufwendige Technik besitzt und nur wenig Stickstoff verbraucht. Plötzliche Temperaturänderungen, wie bei den Kammergefriergeräten treten nicht auf, die Auslösung des Seedings ist einfach und stört den Gefriervorgang praktisch nicht. Als Nachteile sind die fehlende Automatisierung und damit die Notwendigkeit, anzuführen, den gesamten Gefrierprozeß persönlich zu überwachen und die Kühlgeschwindigkeit manuell zu regeln (77,167,194).

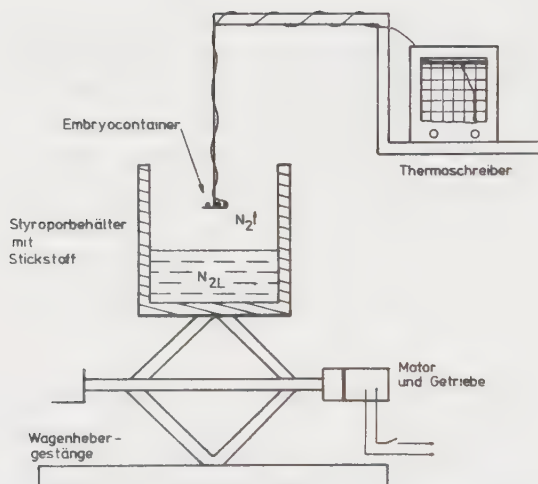


Abb.2.2.6.4 Gefriergerät "Modell Neustadt/Aisch" (vereinfacht nach HÜNLICH 1982)

2.2.6.5 Das automatisierte "Offene System"

Eine Fortentwicklung des gerade vorgestellten Gefriergerätes entstand am Institut für Regelungstechnik und an der Universitäts Frauenklinik Erlangen. Dabei wurde ein microcomputer-gesteuerter Regler des Planer-Kammergefriergerätes (PTC 200) zur Steuerung eines Präzisionsspindelhebewerkes benutzt.

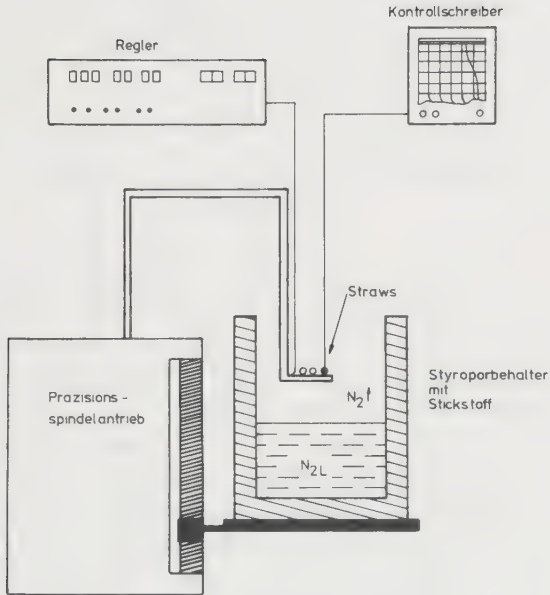


Abb. 2.2.6.5 Das automatisierte "Offene System"

Dieses System wurde ebenfalls schon ausführlich beschrieben (2,3). Zu den Vorteilen des Modells "Neustadt/Aisch" kommt hier noch die automatisierte Regelung des Gefriervorganges, die nach Auslösung des Seedings einen vollkommen selbsttätigen Versuchsablauf ermöglicht. Der Regler vermag auch wesentlich schneller auf Störungen des Temperaturprofils im Schacht zu

reagieren, als es einem Experimentator möglich wäre. Die Nachteile dieses Modelles liegen darin, daß die Temperatur des Stickstoffdampfes als Regelgröße verwendet wird und der Kontrollschreiber, der die Temperatur im Medium mißt, relativ ungenau arbeitet. Diese Maschine ist wegen der Größe des Spindelmotors auch nicht transportfähig.

2.3 Untersuchungen über die Bedeutung des Seedings

Erst in den letzten Jahren begann man sich näher für die Bedeutung des Kristallisationsprozesses beim Tiefgefrieren zu interessieren. Ausgehend von der Beobachtung, daß es zur Unterkühlung des Mediums bis auf -21°C kommen kann, wenn die Kristallisation nicht vorher ausgelöst wird und daß dieses Supercooling die Überlebensrate der Embryonen drastisch reduziert, lösen die meisten Untersucher den Kristallisationsvorgang bei ca. -6°C , also etwa 3 K unter dem Gefrierpunkt des Mediums aus (108,136,217). Die ersten Untersuchungen über die Möglichkeit, den Zeitpunkt des Seedings zu variieren, erschienen 1973 und 1975 (47,50). Später konnten einige Autoren zeigen, daß die Überlebensraten der Embryonen praktisch auf Null fielen, wenn auf -10°C unterkühlt und dann erst "ge-seedet" wurde (25,156,157,162,192,215). Bei all diesen Untersuchungen wurde nur die Temperatur der Kristallisationsauslösung, nicht aber ihre Art variiert.

Da das Supercooling an sich den meisten Zellen nicht schadet (128,129), muß die drastische Reduzierung der Überlebensraten mit dem Kristallisationsprozeß oder der raschen Veränderung der Kühltemperatur zusammenhängen (215), worauf später noch eingegangen wird.

2.4 Der Kristallisationsprozeß

Ein entscheidender Vorgang während des Gefrierprozesses ist die Eisbildung im Medium und intrazellulär. Dieser Vorgang ist ebenso selbstverständlich, wie schwer zu fassen. So gibt es zwar Beobachtungen der intrazellulären Kristallisation, aber der Vorgang selbst liegt noch weitgehend im dunkeln (59,100, 102,131,133,134,136,137,139,141,150,151,186,187,228).

2.4.1 Aggregatzustände und Phasen

Nicht immer wird streng zwischen dem Aggregatzustand eines Stoffes, der fest, flüssig oder gasförmig sein kann und den Phasen unterschieden. Unter Phasen versteht man im engeren Sinne Systeme aus einer Art von Atomen, Molekülen oder Ionen, die von anderen Systemen durch physikalische Grenzen getrennt sind (70,76). Ein Festkörper kann also in mehreren Phasen vorkommen, z.B. in amorphem und kristallinem Zustand. Welche Phase aktuell vorliegt, wird durch den Druck und die Temperatur bestimmt, wenn das Volumen konstant gehalten wird. Die Abbildung 2.4.1 stellt das Zustandsdiagramm für reines Wasser mit unterbrochenen und das für eine 1.5 m Lösung, wie sie z.B. bei der Verwendung von 1.25 m DMSO in mod. PBS als Kryoprotektivum vorliegt, mit durchgezogenen Linien dar. Die Verschiebung ergibt sich durch die Erniedrigung des Dampfdruckes in Lösungen (70,76,86,182).

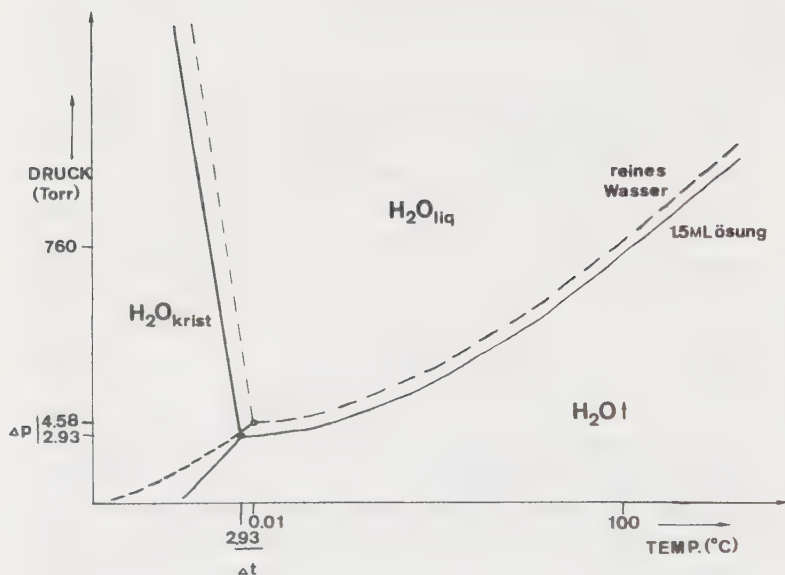


Abb. 2.4.1 Zustandsdiagramm für reines Wasser (—) und für eine 1.5 m wässrige Lösung (___)

Nach dem ersten Raoultischen Gesetz läßt sich die Dampfdruck- und Gefrierpunktniedrigung nach der Formel

$$\Delta p = E \times n = \Delta t \quad (1)$$

errechnen. Mit $E = 1.86 \text{ grad/Mol}$ ergibt sich für die von uns verwendete Lösung von 1.25 m DMSO in modifiziertem Dulbecco's PBS mit 10% foetalem Kälberserum ein Δt von -2.9 °C oder 270.3 K . Wird die Temperatur einer Gefrierschutzlösung – bei konstantem Druck – unter -3 °C gesenkt, so kann sich im Medium Eis bilden. Beim praktischen Einfrieren zeigt sich jedoch, daß die Kristallisation spontan erst bei -20 °C beginnt. Eine Erklärung für die Möglichkeit, soweit zu unterkühlen und die Lösung metastabil zu erhalten, liegt darin, daß auch für den Prozeß

des Gefrierens ein gewisser Betrag an Aktivierungsenergie ΔH notwendig ist. Diese Energie ist erforderlich, um z.B. die Abstoßungskräfte zwischen gleich geladenen Polen der Wassermoleküle zu überwinden oder diese aus der Hydrathülle von Ionen zu lösen. Durch das Einbringen eines Kristallisationskeimes wird weniger Aktivierungsenergie benötigt, da z.B. günstige Anlagerungsstellen für Wassermoleküle vorhanden sind (65,88,129).

Ein solcher Kristallisationskeim kann dem Medium von außen zugeführt oder aber durch Berührung der Wand des Embryobehälters mit einem sehr kalten Gegenstand durch lokales Unterkühlen gebildet werden (15,85,105,142,155,156,209,220). Unterläßt man das Seeding, so bilden sich bei tieferen Temperaturen spontan Kristallisationskeime durch Umlagerung und Vergrößerung der schon bei Raumtemperatur vorhandenen "quasi kristallinen Bezirke" in der Lösung (70). Kommt es nach einer Unterkühlung zur Kristallisation, so erfolgt diese sehr schnell und die freiwerdende Reaktionswärme führt zu einem Temperaturanstieg bis knapp unter den Gefrierpunkt des Mediums. Diese Kristallisationswärme stammt aus der Entropieänderung bei der Phasenumwandlung flüssig / fest des Wassers der Gefrierlösung.

Da die Entropieänderung als mathematische Funktion der Wahrscheinlichkeit aufgefaßt werden kann, daß sich ein System in einem bestimmten Zustand befindet und mit fallender Temperatur die Wahrscheinlichkeit zunimmt, daß die Lösung gefriert, ist die Entropieänderung ΔS umso größer, je tiefer die Lösung unterkühlt wurde. Dabei gilt:

$$\Delta S = R \times \ln W \quad (2)$$

mit R = Gaskonstante und W = relative Wahrscheinlichkeit. Für Temperaturen unter 0°C gilt angenähert aber

$$W \sim |T| \quad (3)$$

und nach Einsetzen in (2)

$$\Delta S = R \times \ln(a \times T) \quad (4)$$

mit a = Proportionalitätsfaktor.

(Modifiziert nach 65,88)

Nach dem makroskopisch sichtbaren Kristallisationsvorgang sind aber die Möglichkeiten der Lösung noch nicht ausgeschöpft, ihre Struktur zu verändern. Zum einen kristallisiert nicht das gesamte Wasser in einem Schritt aus. Besonders, wenn die Kristallisation knapp unterhalb des Gefrierpunktes beginnt, nimmt dieser Vorgang einige Zeit in Anspruch. Zumindest in Medien, die Gefrierschutzmittelzusatz enthalten, bleiben bis zum Abschluß der Kristallisation die Flüssigkeitsräume untereinander verbunden, wie SLOVITER sehr anschaulich zeigen konnte (bei 116).

Auch die Form der Kristalle kann sich ändern. Dies geschieht zum Beispiel durch Umstrukturierung und Wachstum von kleinen zu großen Einzelkristallen, da diese einen geringeren Betrag an innerer Energie besitzen (27,86,207). Während der Anteil des flüssigen Wassers fällt, nimmt die Konzentration der Elektrolyte stark zu und kann Werte erreichen, die über dem Sättigungspunkt liegen (19,129). Zu den beschriebenen Strukturänderungen der Lösung kommt es im Bereich um $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ und nochmals bei ca. $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und zwar sowohl beim Abkühlen als auch beim Erwärmen der Lösung (120,122,127,129,131,137,226). Bei $-112\text{ }^{\circ}\text{C}$ können nochmals Strukturumwandlungen kristallin / glasartig stattfinden (119,178).

Die Auswirkungen solcher Veränderungen des Mediums auf die Embryonen werden im Abschnitt 2.5 besprochen

2.4.2 Die Veränderungen im Medium bei der Kühlung und Kristallisation

Nahezu alle Größen der Physikalischen Chemie sind temperaturabhängig. So ist der pH-Wert über das Ionenprodukt des Wassers mit der Temperatur gekoppelt, da dessen Betrag mit abnehmender Temperatur drastisch sinkt (5,70,76). Allerdings konnten BERG et al. (19,20) zeigen, daß die Anwesenheit von Glycerol oder DMSO im Medium die Spanne der Änderungen des pH-Wertes und der Zusammensetzung der Lösung bei einer bestimmten Temperatur signifikant vermindern kann, indem ein größerer Anteil des Wassers flüssig gehalten wird.

Durch die sinkende Temperatur und die teilweise Kristallisation ändert sich auch der Dampfdruck der Lösung auf mindestens zwei Wegen. Zum einen ist die BROWNsche Molekularbewegung und damit die Diffusions- und Verdampfungsgeschwindigkeit der Teilchen temperaturabhängig. Zum anderen steigt die Konzentration der gelösten Stoffe stark an, wenn das Wasser auszukristallisieren beginnt und damit fällt der Dampfdruck weiter (70,88).

Auch der osmotische Druck ist nach der Beziehung

$$\Pi = c \times R \times T \quad (5)$$

umso niedriger, je tiefer die Temperatur im Medium fällt. Ebenfalls rein physikalisch bedingt ist der Abfall des Membranpotentials bei sinkender Temperatur, wobei gilt:

$$E = T \times \left(\frac{R}{z \times F} \times \ln \frac{c_1}{c_2} \right) \quad (6)$$

mit c_1 / c_2 = Elektrolytkonzentration innerhalb / außerhalb der Zelle; E = Membranpotential; F = Faradaykonstante; R = Gas-konstante; T = Temperatur in K; z = Ionenwertigkeit (nach 113)

Da in den Gleichungen (5) und (6) Π und E der absoluten Temperatur direkt proportional sind, ergibt sich eine lineare Änderung dieser Größen:

K	Temperatur °C	Korrekturfaktor für Π und E
310	+ 37	1.00
273	+ 0	0.88
268	- 5	0.86
263	- 10	0.85
243	- 30	0.78
213	- 60	0.69
173	- 100	0.56
77	- 196	0.25

2.4.3 Die Veränderungen an Lebenden Geweben während des Tiefgefriervorganges

Ein Vorgang von elementarer Bedeutung für die Überlebensrate kryokonservierter Embryonen ist die intrazelluläre Eisbildung. Schon die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet zeigten, daß sie eng mit dem Absterben der Zellen nach dem Auftauen korreliert ist (59,127,188). Da der Schädigungsmechanismus später (2.5) näher erläutert wird, sei hier nur Zeitpunkt und Art der Induktion besprochen. Nach neueren Untersuchungen kommt es erst unterhalb von -45°C zur intrazellulären Eisbildung, wenn das Medium Gefrierschutzmittel enthält (106).

RALL et al. (175,176) berichteten kürzlich, daß sich intrazelluläres Eis erst beim langsamen Wiederauftauen im Bereich von -70° bis -55°C bildet.

Es scheint auch so zu sein, daß nur extrem langsam eingefrorene Zellen (Kühlrate kleiner 0.15 K/min) nicht intrazellulär gefrieren, während alle anderen Gewebe Kristalle enthalten, die wegen ihrer submikroskopischen Größe nicht entdeckt werden (96,107, 129).

In jedem Fall geht man davon aus, daß die intrazelluläre Kristallisation dann eintritt, wenn die Embryonen unter dem Mikroskop plötzlich dunkel erscheinen. Dieser Vorgang, in der englischsprachigen Literatur als "sudden blackening" oder "flashing" bezeichnet, kommt durch die Lichtbrechung der vielen kleinen Eiskristalle zustande.

Eine intrazelluläre Eisbildung oberhalb von -10°C wurde in keinem Medium bisher beobachtet. Als Erklärung hierfür bietet sich an, daß erst ab dieser Temperatur Eiskristalle einer so geringen Größe vorhanden sind, daß sie durch die Poren der Cytoplasmamembran ins Zellinnere vorwachsen können. Das plötzliche Auftreten der Kristallisation spricht aber auch für eine multifokale Eisinduktion in der Zelle.

2.5 Der Schädigungsmechanismus beim Tiefgefrieren

Nachdem man zunächst erstaunt war, daß lebende Zellen das Einfrieren überstehen können, ist man heute bestrebt, Erklärungen dafür zu finden, warum ein gewisser Teil der Embryonen trotz der sehr verbesserten Technik den Gefrierprozeß nicht überlebt. Natürlich machte man sich schon früh Gedanken über die Natur der schädigenden Vorgänge. CHANG berichtete schon 1947, daß ein "thermischer Schock" eintreten könne, wenn Spermien unter $+10^{\circ}\text{C}$ gekühlt werden (40,41). Obwohl noch längere Zeit die Bezeichnung "thermal shock" verwendet wurde, meinte LUYET schon 1949 den Schädigungsmechanismus zu kennen: die mechanische Beanspruchung durch Eiskristalle, die sich beim Gefrieren in und außerhalb der Zelle bilden, sollte diese abtöten können (118).

Diese Ansicht äußerten 1951 auch SMITH et al. (191). PARKES (165) glaubte damals, daß die erhöhte Elektrolytkonzentration im gefrierenden Medium für die Schädigung des lebenden Gewebes verantwortlich sei. Ebenfalls über Untersuchungen der Schutzwirkung von Glycerol kam LOVELOCK 1953 zu dem Ergebnis, daß der Anteil des bei einer bestimmten Temperatur flüssig vorliegenden Wassers entscheidend dafür sei, ob Hämolyse eintritt oder nicht.

Schon ein Jahr später berichtete er, daß der Zelltod nicht durch die mechanische Beanspruchung der Membranen, sondern durch den osmotischen Schock eintrete, der aus der Veränderung der Elektrolytkonzentration im Medium und dem Ungleichgewicht zum Zellinneren resultiert (114,115,116,117). Diese Ansicht wird durch neuere Untersuchungen unterstützt (60,239,240) und FARRANT konnte ergänzen, daß der Zelltod in hohem Maße durch osmotische Vorgänge beim Auftauen verursacht wird (61,62).

Erste Untersuchungen über die Ursachen der Schädigung von Mäuseoocyten legte SHERMAN 1958 vor. Darin kommt er zu dem Schluß, daß die intrazelluläre Kristallisation die eigentliche Ursache einer letalen Schädigung der Eizellen darstellt. Diese tritt ein, wenn die Zellen durch zu hohe Kühlraten keine Zeit haben, genügend zu dehydrieren, um sich den veränderten osmotischen Bedingungen im Medium anzupassen (187,188). Hier wird also erstmals die Bedeutung der Dehydration und der Kühlrate für das Auftreten von Schäden betont. 1963 summiert SHERMAN, daß maximale Überlebensraten dann zu erreichen seien, wenn die Bildung intrazellulären Eises durch kleine Kühlraten oder durch Vorinkubation in hypertonen Lösungen minimiert werden könne (186).

Im selben Jahr veröffentlichte MAZUR (127) nach Untersuchungen an Hefepilzen, anderen Einzellern und Erythrozyten seine "klassische" Theorie über die Vorgänge in Zellen beim Kühlen. In dieser Arbeit wird unter einigen vereinfachenden Annahmen, z.B. daß die Zellmembran zwar für Wasser vollständig permeabel sei, daß aber keine anderen Diffusionsprozesse stattfänden, ein komplexes mathematisches Modell der Austauschvorgänge zwischen Zelle und Medium vorgestellt. Die dort abgeleiteten Differentialgleichungen 2.Ordnung, die aufgrund der Voraussetzungen numerisch lösbar sind, lassen folgende Aussagen über die Art der Zellschädigung zu, die MAZUR bei späteren Veröffentlichungen auch explizit darlegte (128,129,130,135,137,140,141). Es gibt im wesentlichen zwei Schädigungsmechanismen, denen lebende Zellen beim Einfrieren unterworfen sind.

* 1. Die Bildung von intrazellulärem Eis

Zur Bildung intrazellulären Eises kann es kommen, wenn die Zellen so schnell gekühlt werden, daß sie nicht genügend Wasser an die Umgebung abgeben können. Betrachtet man die von MAZUR für die Zusammenhänge zwischen dem Volumen des intrazellulären Wassers und der Temperatur aufgestellten Gleichung, so stellt man fest, daß sie über die Kühlrate B zeitabhängig ist.

$$T \times e^{\tau} \times ((b \times T + 1) \times e^{\tau} - \frac{A \times R k \ln 2}{B \times (V + n 2v)}) \times \frac{dV}{dT} = \frac{L A k 1}{B v} \quad (7)$$

wobei $e^{\tau} = e^{b(t_1 - t_2)}$; $v = v_1^0$; $B = \frac{dT}{dt}$ in MAZURs Originalgleichung entspricht.

Der Term auf der rechten Gleichungsseite wird umso größer, je kleiner die Kühlrate ist. Damit ist aber auch die Volumenänderung mit der Temperatur (dV/dT) umso größer, je kleiner die Kühlrate gewählt wird.

Intrazelluläres Eis tritt erst unterhalb von -10° bis -12°C auf, was damit begründet wird, daß erst ab dieser Temperatur Eiskristalle von so geringer Größe existieren können, daß sie die Membranporen, die einen Durchmesser von $(3.5 \text{ bis } 8.0) \times 10^{-10}\text{m}$ haben sollen, durchwachsen können und so die intrazelluläre Kristallisation induzieren. Befindet sich bei dieser Temperatur nur noch 10% des ursprünglich vorhandenen Wassers in der Zelle, so bilden sich keine Eiskristalle, da dieses restliche Wasser wohl proteingebunden vorliegt. Enthält die Zelle dagegen mehr Wasser, so bilden sich umso kleinere Eiskristalle, je höher die Kühlrate gewählt wird. Bei tieferen Temperaturen oder beim Auftauen können diese noch wachsen, wenn die Änderungsgeschwindigkeit der Temperatur entsprechend klein ist. Diese Bildung von großen Kristallen in den Zellen soll ausschlaggebend dafür sein, daß schnell eingefrorene Zellen langsames Auftauen nicht vertragen, da die intrazellulären Membransysteme mechanisch zerstört werden.

* 2. Die sogenannten "solution effects"

Dabei handelt es sich um Schäden, die durch die hohe Elektrolytkonzentration im Medium verursacht werden, wenn die Kühlrate zu niedrig ist. MAZUR macht für diese Schäden die osmotische Wirkung verantwortlich, die derartig hohe Konzentrationen von Ionen haben. Vor allem beim Auftauen kommt es dann zu osmotischen Effekten, besonders wenn, wie allgemein üblich, beim Einfrieren Kryoprotektiva verwendet werden. Als Konsequenz dieser experimentell abgeleiteten Theorien ergab sich, daß für jede Zellart eine von der Wasser- und Gefrierschutzmittelpermeabilität, dem Oberflächen-Volumen-Verhältnis und dem Gehalt an gelösten Stoffen in der Zelle, abhängige optimale Kühlrate existieren muß, bei der die Bildung von intrazellulärem Eis und die osmotische Schädigung minimal ist.

Nachdem ALI MANSOORI 1975 MAZURs Gleichung präzisieren konnte (4), legte FAHY 1981 (58) eine vereinfachte Form vor, die zudem berücksichtigt, daß es sich bei dem Gefriermedium nicht um eine ideale Lösung handelt und daß sich verschiedene Parameter, z.B. die Membranpermeabilität, mit der Temperatur ändern. Da diese Gleichung schon auf kleinen Rechnern lösbar ist, steht erstmals ein mathematisches Instrument zur Planung von Kühlprofilen zur Verfügung.

Im Gegensatz zu MAZUR meinte MERYMAN, daß die Zellen durch die Elektrolytkonzentration beim Einfrieren geschädigt werden, wenn das Zellvolumen als Reaktion auf die osmotischen Verhältnisse so stark schrumpft, daß ein "kritisches Volumen" unterschritten wird. Dabei sollen irreversible Schäden an der Cytoplasmamembran entstehen. Andere Autoren teilen diese Ansicht (59,148, 149,232). Durch eine Salzdenaturierung der Membranproteine soll es zu Membranlücken und deswegen zu einer Inaktivierung der K-Na-ATPase durch den Verlust des gesamten intrazellulären Kaliums kommen (45,150).

BANK kam zu dem Schluß, daß schnell eingefrorene Zellen hauptsächlich durch die Rekristallisationsvorgänge beim Wiederauftauen geschädigt werden (14,15).

Die Ansicht, daß Denaturierungsvorgänge an Membranproteinen und Enzymen die Zelle schädigen, wurde auch von HEBERER (73) und BIGGERS (23) geteilt. HEBERER zeigte in seiner Arbeit, daß manche Membranproteine schon bei 0 °C inaktiviert werden. Dadurch kommt es zu Änderungen der Membranpermeabilität, die tödliche Ausmaße erreichen können.

Wichtige Beiträge zur Klärung der Ursachen der Schädigung durch den Tiefgefrierprozeß wurden auch von LEIBO erbracht. Nachdem er zunächst nachweisen konnte, daß es zellarttypische optimale Kühlraten gibt, wie MAZUR vorausgesagt hatte (100,101,102), trug er später durch die Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten für Glycerol wesentlich zur Präzisierung des MAZURschen Computermodelles bei (97,99).

Schließlich ergaben Beobachtungen unter einem speziellen Cryomikroskop, daß intrazelluläres Gefrieren sehr eng mit dem Absterben der Zellen nach dem Auftauen korreliert ist (106,107). Dies wurde auch von anderen Autoren bestätigt (69,147).

OGAWA konnte ergänzend durch Vergleich von kugelförmigen und diskuiden Kaninchenmorulae zeigen, daß das Oberflächen-Volumen-Verhältnis eine wichtige Rolle für die Überlebensfähigkeit der Embryonen spielt, was ja ganz den bestehenden Theorien entspricht, da die Geschwindigkeit von Diffusions- und Transportprozessen entscheidend vom Verhältnis der Zelloberfläche zum Zellvolumen bestimmt wird (162).

Die abschließende Graphik soll einen Überblick über das Geschehen beim Kühl- und Auftauvorgang geben.

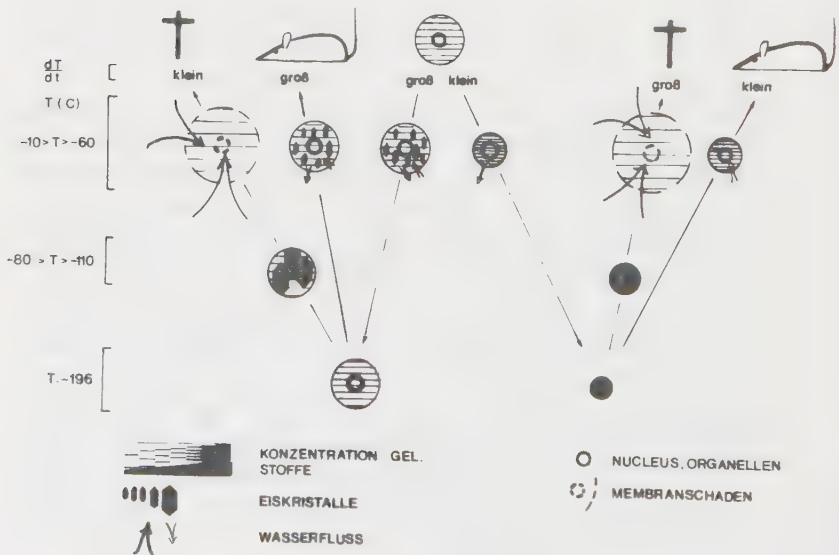


Abb. 2.5.1 Übersicht über die physikalischen Vorgänge bei der Kryokonservierung und ihre Auswirkungen auf Mäuseembryonen

3 Material und allgemeine Methodik

3.1 Tiermaterial

Als Embryonenspender sowie als "Ammenmütter" wurden 6 bis 14 Wochen alte weiße Mäuse des Stammes NMRI/Han. aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht der Hochschule Hannover sowie aus eigener Zucht verwendet.

Auf eine Superovulation wurde verzichtet, um Embryonen gleichmäßig guter Qualität zu erhalten.

Die Weibchen wurden in Gruppen von 10 - 15 Tieren, die Männchen einzeln, im teilklimatisierten Stall gehalten, Wasser und pelletiertes Futter (Altromin) standen ad libitum zur Verfügung. Die Paarung erfolgte, indem ein bis drei Weibchen über Nacht zu einem Männchen gesetzt wurden. Das Vorhandensein eines Schleimpfropfes (Plug) in der Vagina am nächsten Morgen galt als Beweis für eine erfolgte Kopulation und bezeichnete den ersten Tag der Gravidität.

Die "Ammenmütter" wurden in gleicher Weise mit vasktomierten Böcken verpaart, deren Infertilität zuvor über mindestens acht Wochen geprüft und gesichert worden war.

Am vierten Tag der Gravidität wurden die für die Versuche benötigten Embryonen durch Ausspülen aus dem Uterus der Spendertiere (siehe 3.3.1) gewonnen, wobei nur Morulae und Blastozysten verwendet wurden.

Die Embryonen konnten in folgende Untergruppen aufgeteilt werden:

1. Morula

massiver Zellhaufen mit mehr als 16 Zellen

2. Junge Blastozyste

in dem Zellhaufen bilden sich ein oder mehrere kleine Vesikel

3. Blastozyste

ein deutliches Blastozoel ist zu erkennen, eine Trennung in Trophoblast und Embryoblast aber noch nicht möglich, die Zellen scheinen den Hohlraum mehrlagig zu umgeben

4. Expandierte Blastozyste

das Blastozoel ist vollständig entwickelt, der Embryoblast recht deutlich abgrenzbar, die Zona pellucida jedoch noch völlig intakt

5. Geschlüpfte Blastozyste

die Zona pellucida ist nicht mehr vorhanden oder fast verlassen, der vorher "pralle" Embryo erscheint zusammengefallen.

Dieses Stadium wurde für Tiefgefrierversuche nicht mehr verwendet.

3.2 Medien und Kulturbedingungen

Zum Ausspülen der Embryonen, zur Zwischeninkubierung und teilweise zur Kultivierung wurde DULBECCOs PBS (Phosphate Bufferd Saline) der Firma Sera verwendet, das nach WHITTINGHAM (209) modifiziert und dem 10% foetales Kälberserum zugesetzt worden war.

Als Kryoprotektivum diente Dimethyl Sulfoxid (DMSO) in mod. PBS in einer Endkonzentration von 1.25 Mol.

In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Kultivierung in HAMs F10 Medium, das nach folgendem Rezept hergestellt wurde:

NaHCO ₃	60 mg
Glucose	55 mg
Streptomycin	25 mg
Penicillin	3 mg
Stammlösung	ad 50 ml

Als Kulturmethode wurde die Inkubation im Tropfen gewählt, um die Begutachtung der Embryonen im Umkehrmikroskop einigermaßen zeitsparend durchführen zu können. Dabei wurden Tropfen mit einem Volumen von ca. 0.1 bzw. 0.5 ml unter Paraffinöl verbracht. Als Gefäße dienten Petrischalen der Firma Falcon mit einem Durchmesser von 25 mm.

Die notwendigen Umweltbedingungen wurden den Embryonen durch Einbringen in einen Exikator, in den das Gasgemisch direkt eingeleitet wurde und der in einem Brutschrank der Firma Haereus stand, geboten. Das verwendete Gasgemisch bestand aus Luft und 5% CO₂, die Temperatur wurde bei 36.8°C konstant gehalten und die relative Luftfeuchte betrug etwa 100%.

3.3 Der Ablauf der Tiefgefrierversuche

3.3.1 Die Embryogewinnung

Am Vormittag des vierten Graviditätstages wurden die Embryonenspender durch cervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Peritoneums und Herausluxieren des Darnpaketes wurden beide Uterushörner herauspräpariert. Nachdem jedes Horn mit etwa 1 ml PBS in ein Uhrglas gespült worden war, konnten die Embryonen unter einem Wild Stereomikroskop aufgesucht und mittels einer fein ausgezogenen Glaskapillare in sauberes PBS umgesetzt werden, wobei sie "gepoolt" wurden.

Nachdem alle Embryonen auf diese Weise gewonnen waren, begann sofort die Inkubierung im Gefrierschutzmittel.

3.3.2 Die DMSO - Reihe

Die gepoolten Embryonen wurden morphologisch vorsortiert, die einwandfreien in 0.5 m DMSO-Lösung umgesetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach zehn Minuten kamen sie in 1.0 m Lösung und nach weiteren zehn Minuten in 1.25 m DMSO in PBS, wo sie dann 30 Minuten verblieben. Die zweite Hälfte dieser Zeit wurde bei größeren Embryonenzahlen zur morphologischen Beurteilung genutzt, so daß das anschließende Einbringen in die Plastikröhrchen zeitgerecht erfolgen konnte. Wegen seiner Bedeutung wird diese morphologische Beurteilung der Embryonen gesondert besprochen (siehe 3.4).

3.3.3 Das Einbringen in die Straws

Nach der morphologischen Beurteilung wurden die Embryonen gleichmäßig auf bis zu vier Straws verteilt, wobei etwa zehn bis 50 auf jedes Röhrchen kamen. Dies erfolgte wiederum mit einer Glaskapillare und zwar so, daß noch ein geringer Luftraum in dem Embryocontainer blieb, der anschließend mit einer Kunststoffkugel verschlossen wurde. Die Füllung des "Erlanger Straws" mit Gefrierschutzmittel wird in 3.7.2. näher besprochen.

3.3.4 Der Gefrierprozeß

Die fertig gefüllten Straws wurden danach auf den Träger der Gefriereinrichtung aufgelegt, die noch während der DMSO-Reihe betriebsbereit gemacht worden war (siehe 3.6.4). Mindestens bis zum Abschluß der Kristallisation wurde der Versuchsablauf noch überwacht, um die erforderlichen Daten protokollieren zu können

Nach Erreichen der Endtemperatur von -30°C wurden die Embryocontainer direkt in flüssigen Stickstoff umgesetzt und dort einen bis zu zwanzig Tagen gelagert.

3.3.5 Das Auftauen

Die "Erlanger Straws" wurden einzeln durch Einbringen in ein $+15^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad aufgetaut, in dem sie genau 30 Sekunden gehalten wurden. Es ergibt sich also für alle Versuche eine Auftaugeschwindigkeit von etwa $+400\text{ K/min}$. Danach wurden die Straws sofort in der bei 3.7.3 beschriebenen Weise in ein Uhrglas entleert und durchgespült, die Embryonen unter dem Stereomikroskop aufgesucht und in die Ausverdünnungsreihe "eingeschleust".

Dabei wurden die Morulae und Blastozysten für jeweils fünf Minuten und bei $+37^{\circ}\text{C}$, durch eine in 0.25 Mol Schritten fallende Reihe von DMSO-Lösung in PBS gebracht, die bei 1.0 Mol begann. Danach wurden sie bis zur morphologischen Beurteilung zwischeninkubiert.

3.3.6 Die Kultivierung

Nach der eingehenden morphologischen Beurteilung unter dem Umkehrmikroskop wurden die Embryonen für mindestens zwei Stunden im Tropfen kultiviert (siehe 3.2).

Ein Teil der Embryonen wurde anschließend transferiert, der Rest weiterkultiviert und nach 24 stündiger Bebrütung wiederum sorgfältig mikroskopisch beurteilt.

3.3.7 Der Transfer

Als "Ammenmütter" dienten 8 bis 24 Wochen alte Weibchen, die sich am Tag 3 einer Pseudogravidität befanden.

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit 0.18 bis 0.25 ml Hypnodil i.p. Nach Rasur des Bauches und Hautdesinfektion wurde die Bauchhöhle median eröffnet. Sprach der Aspekt der Ovarien für eine intakte Pseudogravidität der richtigen Synchronität, erfolgte der Transfer möglichst atraumatisch in beide Uterushörner. Der Verschluß der Bauchdecken erfolgte durch fortlaufende Naht.

Weitere Einzelheiten zur Operations- und Transfertechnik können der Arbeit von HÜNLICH (77) entnommen werden.

3.3.8 Die explorative Laparatomie

Am 14. bis 16.Trächtigkeitstag wurde eine Laparatomie durchgeführt, um die Zahl der Implantationen und Feten pro Uterushorn zu ermitteln, was besonders wichtig war, wenn in beide Hörner Embryonen aus verschiedenen Versuchsgruppen transferiert worden waren. Die Operationstechnik entsprach dabei sinngemäß dem Vorgehen beim Transfer. Die Mäuse warfen danach normal am 21. oder 22. Tag der Gravidität.

3.4 Die Beurteilung der Embryonen

Die Beurteilung der Embryonen, die vor und nach dem Tiefgefriervorgang und nach der Kultivierung notwendig war, erfolgte mittels eines Inversen Kameramikroskopes ICM 405 der Firma

Zeiss bei hoher Vergrößerung, so daß ein "Durchschichten" der Embryonen möglich war. Grundvoraussetzung für eine positive Beurteilung war die zeitgerechte Entwicklung zur Morula bzw. Blastozyste. Weiter wurden fünf Qualitätsstufen unterschieden:

- 1 Alle Zellen sind deutlich sichtbar, es liegt keine oder kaum extrazelluläre Granulation vor, der Embryo erscheint rund, die Zona pellucida intakt und der perivitelline Raum schmal.
- 2 Die Zellen erscheinen undeutlich, die extrazelluläre Granulation jedoch nicht verstärkt; sonst wie 1.
- 3 Die Zellen sind auffallend voneinander getrennt und verschieden groß, extrazelluläres Cytoplasma liegt vermehrt vor, die Zona pellucida und der perivitelline Raum erscheinen aber normal.
- 4 Die Zellen sind nur noch undeutlich voneinander abgrenzbar und die Granulation ist stark vermehrt; die Embryonen erscheinen "verklumpt" und/oder entrundet.
- 5 Es sind keine zellulären Strukturen mehr erkennbar und/oder die Zona pellucida ist schwer beschädigt.

3.5 Die physikalischen Untersuchungen

Zur Untersuchung der Vorgänge bei der Kristallisation im Straw wurden bei den Kryokonservierungsversuchen folgende Parameter protokolliert und teilweise auch variiert.

- * Kennung des Straws
- * Versuchsreihe
- * Embryocontainertyp
- * Meßfühler / Embryonen enthalten ?
- * Eingriff in die Regelung erfolgt ?

- * Kühlrate vor, bei und nach der Kristallisation
- * Temperatur bei Beginn der Kristallisation
- * Dauer des Seedings
- * Typ der Kristallisation

Daneben wurden 38 Gefriervorgänge ohne Embryonen durchgeführt, bei denen zusätzlich die Temperatur protokolliert wurde, bei der der Kristall die gegenüberliegende Seite des Straws erreicht hatte und bei der die Kristallisation abgeschlossen erschien. Die Temperatur der Embryocontainer konnte aus der Temperatur bestimmt werden, die vom 2. Meßfühler registriert wurde, da dieser und die untersuchten Straws immer in einer Ebene lagen.

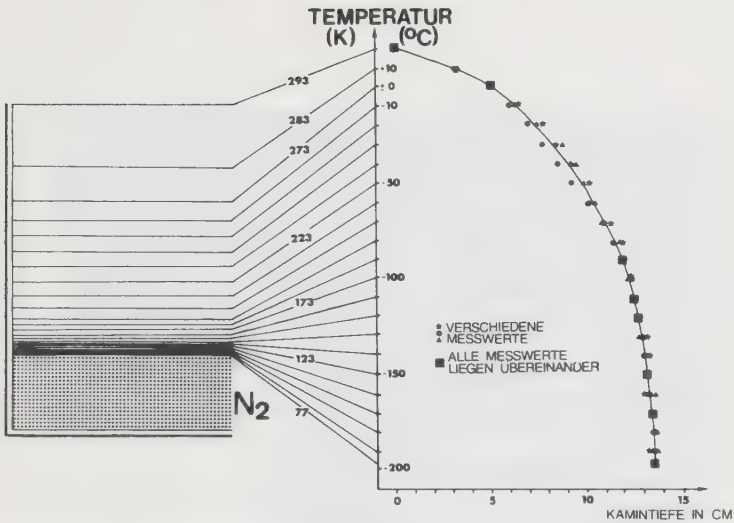
3.6 Die Gefriereinrichtung "CTE 8000"

Die verwendete Gefriereinrichtung, die am Institut für Regelungstechnik der Universität Erlangen-Nürnberg unter der Leitung der Herren DDrs. Dittrich und Wurmthaler entwickelt und gebaut worden war, verbindet eine extrem genaue Regelung mit der Möglichkeit eines "Selbstseedings" der Embryocontainer.

3.6.1 Die Temperaturverteilung im Schacht des Kühlbehälters

Wie schon bei 2.2.6.4 dargestellt, arbeitet das "Offene System" mit einer Bewegung der Embryobehälter durch den Temperaturgradienten, der sich durch den Dampfdruck des flüssigen Stickstoffes im Schacht eines isolierten Kühlbehälters bildet. Die Temperaturverteilung im Kamin ist dabei vom Luftdruck und der Raumtemperatur abhängig.

Die folgende Abbildung zeigt etwas vereinfacht die Isothermen in dem von uns verwendeten Kamin bei einer Raumtemperatur von +22 °C und einem Luftdruck von 1024 mbar.



TEMPERATURABFALL IM KAMIN – 10 grd. ISOTHERMEN

Abb. 3.6.1 Der Temperaturabfall im Kamin des Kühlbehälters

Es ist deutlich zu erkennen, daß die Regelung umso genauer arbeiten muß, je tiefer gekühlt wird. Im Bereich von $-100^{\circ}C$ beträgt die Temperaturdifferenz zwischen der oberen und der unteren Wand des Straws, die 3 mm auseinanderliegen, schon 10K!

3.6.2 Die Beschreibung der Bauteile der CTE 8000

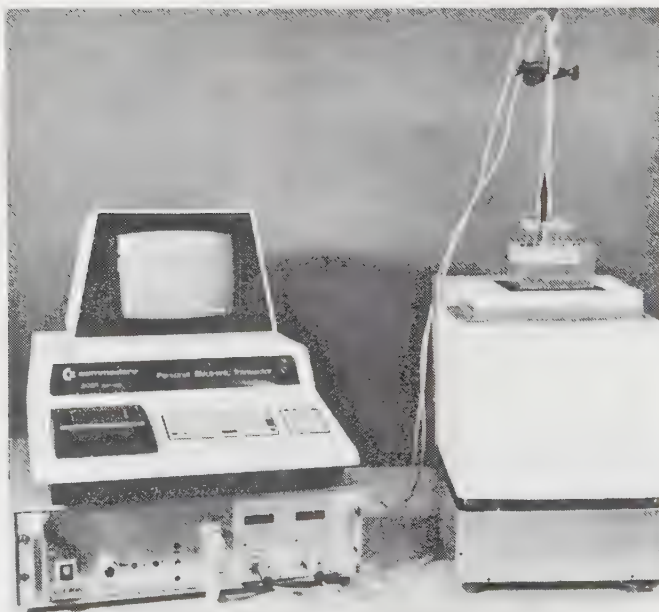


Abb. 3.6.2.1 Die CTE 8000 im Bild

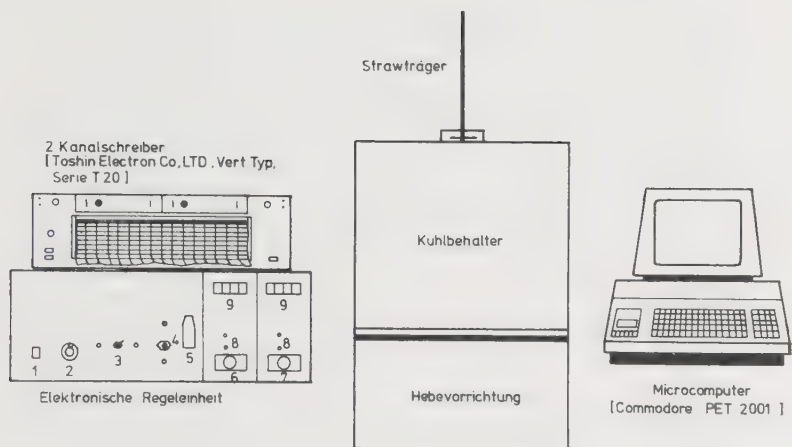


Abb. 3.6.2.2 Gerätebeschreibung

1 = Ein/Aus-Schalter, 2 = Potentiometer, 3 = Schalter manuell/automatisch, 4 = Auf/Ab-Taster, 5 = Anschlußbuchse für die Hebevorrichtung, 6/7 = Buchse für Thermofühler (Regler/Messen), 8 = Stellschrauben für Eichung, 9 = digitale LED-Anzeige der Temperatur

3.6.2.1 Die Hebevorrichtung und der Kühlbehälter

Der Kühlbehälter besteht aus einem Styroporwürfel mit einer Kantenlänge von 0.30m, in den ein "Schacht" mit den Maßen 0.1 x 0.1 x 0.25 m geschnitten wurde.

Die Innenwände des Kamines bestehen in den untersten 0.15 m aus

einer V2A-Stahlwanne, darüber folgt eine Verkleidung aus Plakatkarton, der mit Metallfolie beklebt ist und den Oberrand des Styroporwürfels noch um 0.05m überragt, um das Temperaturprofil in seinem Inneren vor Turbulenzen in der Raumluft abzuschirmen. Dieser Kühlbehälter kann auf einer Plattform vertikal bewegt werden, während die Embryocontainer auf ihrem Träger stationär bleiben. Diese Plattform wird über einen Zahnriemenantrieb bewegt, dessen Herzstück ein Scheibenläufermotor mit einer Nenn-drehzahl von 3000 U/min ist. Ein festes Getriebe setzt die Drehzahl auf 3 U/min herab, durch die unterlagerte Tachoregelung läßt sie sich im Verhältnis 1:3000 variieren, so daß letztlich eine minimale Drehzahl von 0.001 U/min erreichbar ist. Bei einem Durchmesser des Antriebsritzels von 23 mm ergibt sich damit unregelmäßig eine minimale Abkühlrate von 0.035 K/min im Bereich von 0 °C .

3.6.2.2 Die elektronische Regeleinheit

Diese Einheit enthält alle Bauteile zur Steuerung der Gefrier-einrichtung. Der Kühlbehälter kann nach Schaltung auf "manuell" mit über ein Potentiometer wählbarer Geschwindigkeit gehoben und abgesenkt oder über einen eigenen Schalter mit maximaler Geschwindigkeit positioniert werden.

In der Schalterstellung "Automatik" wird die Position des Kühl-behälters durch den Microcomputer kontrolliert. Ein PT100 Tem-peraturmeßfühler (0.9 mm Durchmesser, 15 mm Länge) registriert dazu die Temperatur des Gefriermediums in einem der Straws, welche als Regelgröße verwendet wird. Ein zweiter Meßfühler liefert eine Referenztemperatur aus einem anderen Röhrchen. Die gemessenen Temperaturen werden vierstellig digital in grd. Cel-sius angezeigt und gleichzeitig auf einem 2-Kanal-Analog-Schreiber dargestellt.

Die Temperaturmeßwerte werden über eine A/D (=Analog/Digital) Schnittstelle fünfstellig an den Microcomputer übergeben, in dem das gewünschte Temperatur-Zeit-Profil gespeichert ist. Der Rechner liefert je nach Abweichung zwischen Soll- und Istwert der Innentemperatur über einen Regelalgorithmus ein Stell-signal, das nach einer D/A Wandlung den Motor ansteuert, der seinerseits über einen Zahnriemenantrieb das Anheben oder Absenken des Kühlgefäßes bewirkt.

3.6.2.3 Der Microcomputer

Ein handelsüblicher Commodore PET 2001 wird als Eingabeeinheit für das gewünschte Temperatur-Zeit-Profil und als digitaler Regler verwendet.

Das Gefrierprofil wird vom Benutzer programmiert, indem Kühl- oder Auftauraten bis zu einer Endtemperatur oder für eine bestimmte Zeit festgelegt werden. Die Grenzen der zulässigen Kühlraten werden durch die Drehzahl des Motors bestimmt und liegen bei 0,035 und 100 K/min.

Nach der Eingabe kann das Gefrierprofil graphisch dargestellt und gegebenenfalls korrigiert werden.

Während des automatischen Gefriervorganges kann der Benutzer jederzeit über die Tastatur des Computers in das Geschehen eingreifen:

Die Taste

- H unterbricht das Gefrierprogramm und hält den erreichten Temperaturwert konstant.
- O schaltet die Regelung aus und unterbricht den Gefriervorgang.
- W setzt den Programmablauf fort und übernimmt gleichzeitig den vorliegenden Istwert der Temperatur als neuen Sollwert.

- > springt in die nächste Rampe des Gefrierprogrammes.
- E beendet den Programmablauf vollständig.

Über die Tasten "P" bzw. "T" kann das gewählte Temperaturprofil auf dem Monitor graphisch oder tabellarisch dargestellt werden. Daneben wird auch noch die gemessene Temperatur beider Meßfühler, sowie deren Sollwert und die Zeit seit Beginn des Gefriervorganges ausgegeben.

3.6.2.4 Der Reglerentwurf

Der Reglerentwurf wird durch folgende Aussagen charakterisiert:

- * die Dynamik des drehzahlgeregelten Motors kann im Vergleich zu den anderen Verzögerungen vernachlässigt werden.
- * das Stellsignal ist gleich dem Sollwert für die unterlagerte Drehzahlregelung.
- * als Ausgangssignal wird die Position des Kühlgefäßes verwendet.
- * die nichtlineare Profilkennlinie ergibt den Zusammenhang zwischen der Position und der Außentemperatur.
- * die Temperatur in den Embryocontainern ergibt sich als Differenz zwischen der Außentemperatur und der im Medium gespeicherten bzw. dort durch Kristallisationsvorgänge entstehenden Wärme, wobei der Wärmeübergang zwischen der Umgebung und dem Medium eine wesentliche Rolle spielt.
- * durch diesen Wärmeübergang zwischen der Luft im Kamin und der Gefrierschutzlösung ergibt sich ein Verzögerungssystem mit der Zeitkonstante T , die vom Aggregatzustand des Mediums abhängig ist.
- * vor der Kristallisation beträgt T etwa 70 Sekunden, danach erhöht sich die Zeitkonstante auf ca. 400 Sekunden!

* das Verhalten der beiden PT100 Temperaturmeßfühler kann ebenfalls als Verzögerung 1. Ordnung beschrieben werden, die auftretenden Zeitkonstanten sind durch den besseren Wärmeübergang zwischen Medium und Meßfühler jedoch kleiner.

Als Regelalgorithmus wurde ein Zustandsregler 1.Ordnung implementiert, was einem PD-Regler(Proportional-Differential-Regler) entspricht. der Entwurf als Zustandsregler ermöglicht eine Begrenzung der Stellgröße (maximale Drehzahl des Motors) und eine spätere Erweiterung, z.B. durch Berücksichtigung der Kristallisationsvorgänge.

3.6.3 Die Versuchsvorbereitung

Die beiden Meßfühler wurden regelmäßig ein- bis zweimal pro Woche geeicht, indem Plastikröhrchen mit Aqua tridest. gefüllt wurden. Durch manuelles Heben des Kühlbehälters, der mit flüssigem Stickstoff beschickt war, wurde dieses gefroren und danach wieder auf Raumtemperatur gebracht. Zeigte dabei der Meßfühler in der Gegend von 0°C keine Erwärmung mehr an, wurde die Temperaturanzeige mit Hilfe der Stellschrauben auf einen Bereich zwischen -0.10 und +0.10 grd Celsius einjustiert. Danach wurden die Meßfühler in den Stickstoff gefahren und auf -204 °C (bei einer tatsächlichen Temperatur von -195.8 °C) justiert, um im Bereich zwischen +20 ° und -70 °C eine lineare Temperaturanzeige zu erhalten, wobei die Abweichungen maximal 0.25 K betragen, bei einer Regelgenauigkeit von 0.1 K. Während der Inkubation der Embryonen in der aufsteigenden DMSO-Reihe, wurde zunächst der Kühlbehälter mit 1 bis 1.5 l flüssigem Stickstoff gefüllt und die Meßfühler mit einem "Erlanger Straw" bestückt, wie sie auch für die Embryocontainer verwendet wurden.

Als letzter Schritt brauchte dann nur noch das gewünschte Kühlprofil festgelegt und, nachdem die Straws auf dem Träger lagen, der Programmablauf gestartet zu werden. Eine besondere Wartezeit bis zur Einstellung des Temperaturprofils im Schacht des Kühlbehälters ist nicht erforderlich.

3.7 Der "Erlanger Straw"

3.7.1 Bauprinzip und Modifikationen

Ein wesentliches Merkmal des verwendeten Gefrierverfahrens ist die selbsttätige Auslösung des Kristallisationsprozesses durch die verwendeten Straws. Dadurch wird ein Seeding, also eine künstliche Auslösung der Kristallisation überflüssig und die Eisbildung geht auch wesentlich schonender vor sich.

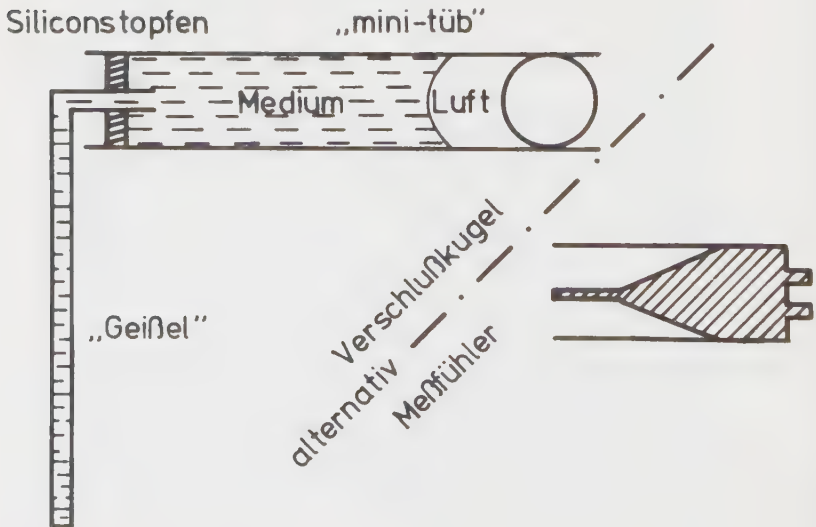


Abb. 3.7.1.1 Das Bauprinzip des "Erlanger Straws"

Das oben abgebildete "Grundmodell" wurde noch etwas modifiziert, um die Verluste durch Explosionen beim Auftauen der Straws zu minimieren und die Herstellung zu vereinfachen.

Zu diesen Explosionen kommt es bekanntlich, wenn Stickstoff in den Luftraum der Embryobehälter diffundiert. Beim schnellen Auftauen entsteht dann in den Plastikröhrchen ein Überdruck, dem diese nicht gewachsen sind. Durch Abdichtung mit flüssigem Silikon oder den Einsatz von Silikonstopfen größeren Durchmessers wurde versucht, diese Diffusion zu verhindern. Es zeigte sich jedoch, daß oft Haarrisse, die beim Kürzen der handelsüblichen "mini-tüb" Röhrchen auf 40 mm entstanden waren, diese Vorgänge verursachen. Deswegen wurden in einigen Versuchen ungekürzte Straws verwendet. Völlig verlustfrei konnte aber erst aufgetaut werden, als nur minimale Luftvolumina in den Behältern verwendet wurden.

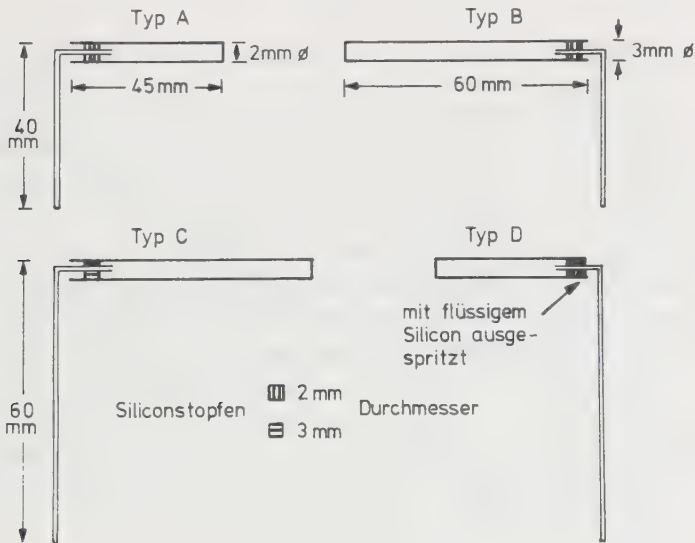


Abb. 3.7.1.2 Die verwendeten Typen des "Erlanger Straws"

Der Typ A entspricht dabei dem Grundmodell und wurde stets für die Bestückung der Meßfühler verwendet.

Der Typ B wurde nur in den Kryokonservierungsversuchen verwendet und unterscheidet sich, bis auf die Länge des Röhrchens, nicht vom Typ A.

Da sich die Herstellung des Types C als außerordentlich schwierig erwies, wurden nur fünf Exemplare erprobt.

Der Typ D wurde ebenfalls nur zur Kryokonservierung von Embryonen verwendet. Das Ausspritzen mit flüssigem Silikon dichtet hier zwar den Straw optimal ab, verhindert aber auch die Bewegung des Stopfens beim Auftauen, die zum Druckausgleich beim Erwärmen des Mediums durch die abnehmende Löslichkeit der Gase notwendig ist.

3.7.2 Das selbsttätige Seeding

Die Spitze der Geißel befindet sich im Kühlschacht 40 bis 60 mm tiefer als der eigentliche Straw. Je nach der Stellung im Kamin herrscht dort eine Temperatur, die 20 bis 60 K unter der Temperatur des Mediums liegt, in dem sich die Embryonen befinden. Erreicht die Temperatur an der Geißelspitze etwa -20°C , so bilden sich dort durch Supercooling Eiskristalle, die während des folgenden Gefriervorganges die Geißel "durchwachsen" und schließlich, wenn im Embryocontainer eine Temperatur knapp unterhalb des Gefrierpunktes herrscht, in diesem den Beginn der Kristallisation induzieren. Durch Variation der Stellung des Meßfühlers zu den Embryobehältern konnte der Ablauf der Kristallisation in diesen in weiten Grenzen gesteuert werden. Das folgende Schema soll den "Selbstseeding"-Prozeß und den Unterschied zum Kontaktseeding verdeutlichen.

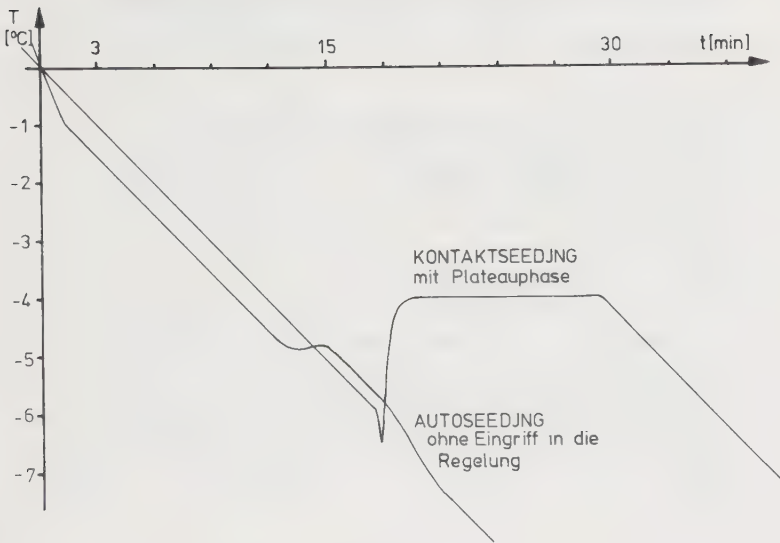


Abb. 3.7.2.1 Temperatur-Zeit-Verlauf beim Kontaktseeding im Vergleich zum Autoseeding (näheres siehe Text)

Eine Variante des Selbstseedings stellt das "Autoseeding" dar, bei dem in den Gefriervorgang gar nicht mehr eingegriffen wird, während beim Selbstseeding noch eine manuelle Ist-Sollwert-Übernahme während des Kristallisationsvorganges erfolgt.

SELBSTSEEDINGVORGANG (SCHEMA)

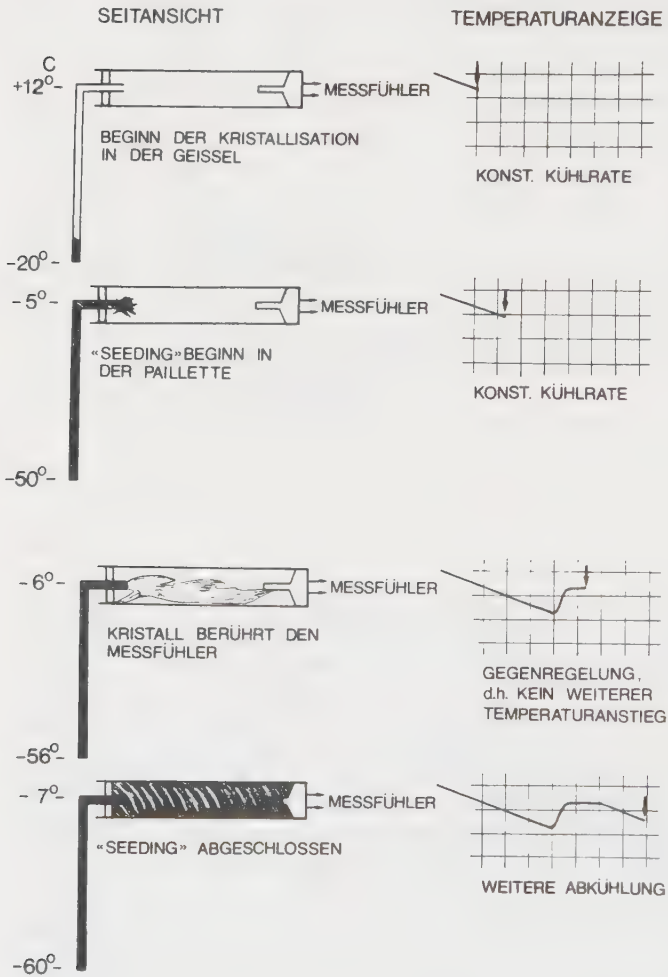


Abb. 3.7.2.2 Der Selbstseedingvorgang im Schema

3.7.3 Die Füllung der "Erlanger Straws"

Der Straw wurde senkrecht gehalten und mittels Spritze und Kanüle luftblasenfrei mit Gefrierschutzlösung gefüllt. An einem vorher angeheizten LötKolben konnte danach die Geißelspitze zugeschmolzen werden, wobei sich keinesfalls Luftblasen in dem PVC Schlauch bilden dürfen, da diese ein "Hochwachsen" der Kristalle verhindern und zum Supercooling im Embryocontainer führen würden.

Jetzt konnte mit Kryoprotektivum soweit aufgefüllt werden, daß noch ca. 15 qmm Luft im Straw blieben, wenn die Embryonen eingebracht und das Röhrchen mit einer Kunststoffkugel verschlossen war.

3.7.4 Die Leerung der Straws

Nach dem Auftauen wurde zunächst die Kugel vorsichtig aus dem Röhrchen entfernt und der Straw auf ein Uhrglas gestellt. Jetzt wurde die zugeschmolzene Geißelspitze abgeschnitten. Das Medium konnte herauslaufen und nach Durchstechen des Stopfens mit einer feinen Kanüle wurde der Embryocontainer mit Gefrierschutzmittel durchgespült. Nun konnten die Embryonen unter dem Stereomikroskop aufgesucht und umgesetzt werden.

4 Untersuchung des Kristallisationsprozesses und der Zuverlässigkeit des Gefriersystemes CTE 8000

4.1 Vorversuche

Diese Vorversuche wurden ebenso wie die Voruntersuchungen zu den Kryokonservierungsexperimenten mit der in 2.2.6.5 beschriebenen Anlage im Juni und Juli 1981 durchgeführt. Neben der Einarbeitung in die notwendige Technik dienten sie dazu, einmal festzustellen, welchen Bedingungen die Embryonen während des Kontaktseeding ausgesetzt sind.

4.1.1 Die Temperatur der Pinzettenspitze beim Kontaktseeding

4.1.1.1 Der Versuchsaufbau

Die Spitze einer 15cm langen anatomischen Pinzette wurde in gleicher Weise wie bei den Kryokonservierungsversuchen durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff für variable Zeiten von 5 Sekunden bis zu 20 Minuten gekühlt. Die Registrierung der Temperatur erfolgte, indem sofort ein Kupfer-Konstantan-Thermoelement zwischen die Branchen des Instrumentes genommen wurde, bis die Temperaturanzeige des Thermoschreibers (Fa. Varian - Rekorder Division, Typ: T Nr.8) konstant blieb. Pro untersuchter Kühlzeit wurden 10 Temperaturmessungen durchgeführt.

4.1.1.2 Ergebnisse

Die untenstehende Tabelle gibt Auskunft über die mittlere Temperatur bei der jeweiligen Vorkühlzeit.

Tab.1 Mittlere Temperatur der Pinzettenspitze in Abhängigkeit von der Vorkühlzeit

Vorkühlzeit in flüssigem Stickstoff	5 sec	10 sec	15 sec	20 sec	30 sec	1 min	5 min	10 min
n	10	10	10	10	10	10	10	10
mittlere Temperatur der Pinzettenspitze $\bar{x}$ (°C)	31.6	69.2	103.8	115.4	109.6	113.6	103.5	108.6
Standardabweichung s	3.37	16.34	7.21	11.19	8.04	11.23	16.05	12.37

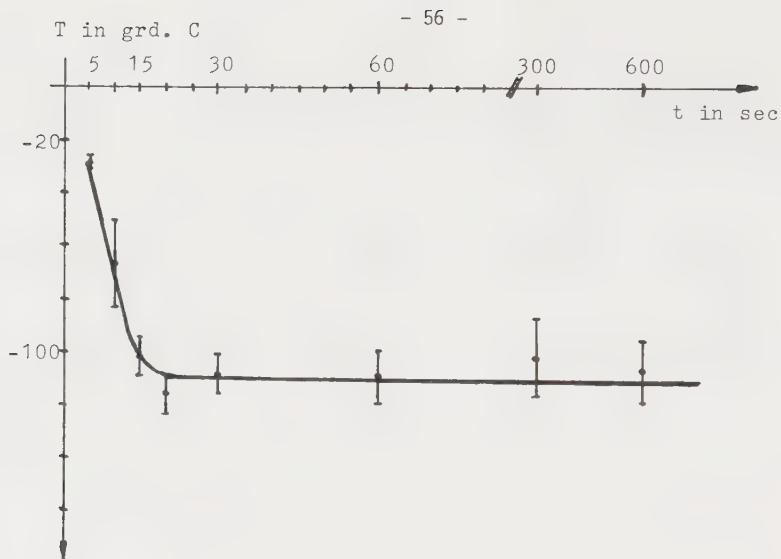


Abb. 4.1.1.2.1 Die Beziehung zwischen der Pinzettentemperatur und der Kühlzeit im Stickstoff

Es wird deutlich, daß schon ab einer Vorkühlzeit von 30 Sekunden die Temperatur an der Spitze des Instrumentes etwa -120°C erreicht. Diese Temperatur steigt auch bei recht langer Inkubation nur unwesentlich an.

4.1.2 Kristallisationsform und Dauer beim Kontaktseeding

4.1.2.1 Versuchsanordnung

Während der Vorversuche zur Kryokonservierung wurden 32 Straws bei -6°C durch Berührung mit der Pinzette geseedet. Die dabei ablaufenden Kristallisationvorgänge wurden beobachtet und ihre Dauer protokolliert. Bei der späteren Versuchsreihe "Vergleich zwischen Kontakt- und Selbstseeding" (siehe 5.3) konnte bei weiteren 17 Embryocontainern die Kristallisationsdauer exakt protokolliert werden.

4.1.2.2 Ergebnisse

Beim Kontaktseeding bildet sich unmittelbar nach Berührung der Wand des Straws ein recht homogener kristalliner Bereich im Röhrchen aus. Dabei gefrieren etwa 30qmm Medium sehr schnell. Von diesem vereisten Abschnitt ausgehend wächst der Mediumkristall schnell durch den Straw und erreicht meist innerhalb weniger Sekunden dessen Ende. Das folgende Schema soll diesen Vorgang verdeutlichen.

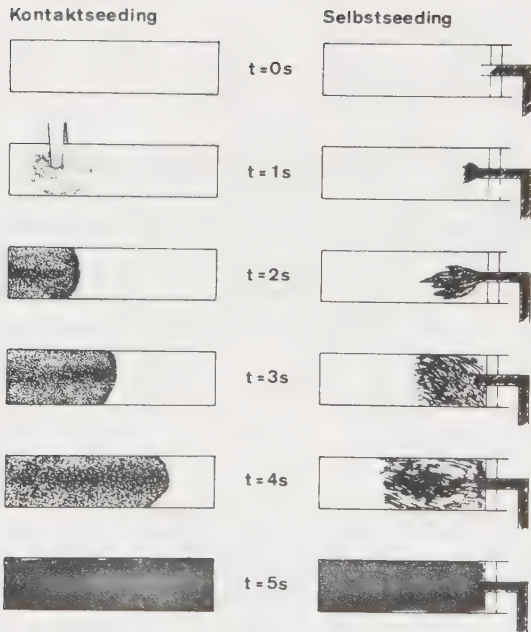


Abb. 4.1.2.2.1 Der Kontaktseedingvorgang im Schema

Wenn auch mit einigen Tricks und viel Erfahrung des Experimentators die Kristallisationsdauer nach einem Kontaktseeding etwas verlängert werden kann, so zeigt die folgende Tabelle doch, daß der Kristallisationsvorgang meist sehr schnell abläuft.

Tab. 2 Die Kristallisationsdauer der Straws mit Kontakt-seeding in Klassen (n=49)

Zeit	Fallzahl n	Häufigkeit (%)	kumulative Häufigkeit (%)
bis 5 sec	15	30.6	30.6
5.1 bis 10 sec	11	22.4	53.0
10.1 bis 30 sec	12	24.5	77.5
30.1 bis 60 sec	7	14.3	91.8
1.1 bis 5 min	3	6.1	97.9
5.1 bis 10 min	1	2.1	100.0
alle Klassen	49	100.0	100.0

4.2 Der Selbstseedingprozeß im Vergleich zum Kontaktseeding

Im Abschnitt 3.7.2 wurde bereits der Ablauf eines Selbst-seedingvorganges beschrieben.

Hier sollen seine Kenngrößen, wie Kristallisationstemperatur und Dauer und die Unterschiede zum Kontaktseeding dargestellt werden.

Als Kristallisationsbeginn wurde der Zeitpunkt betrachtet, an dem eine Kristallnadel, von der inneren Geißelmündung aus, in den Straw vorzuwachsen begann.

4.2.1 Der Selbstseedingvorgang in Abhängigkeit von seiner Dauer

Die Dauer des Kristallisationsvorganges kann durch die Versuchsanordnung variiert werden. Betrachtet man alle Experimente, so ergibt sich ein Spektrum von 3 Sekunden bis zu 30 Minuten Kristallisationsdauer. Es ist verständlich, daß der Vorgang dabei etwas von der in 3.7.2 vorgestellten Norm abweichen kann. Die folgende Abbildung zeigt schematisch einen extrem kurzen und einen längeren Verlauf.

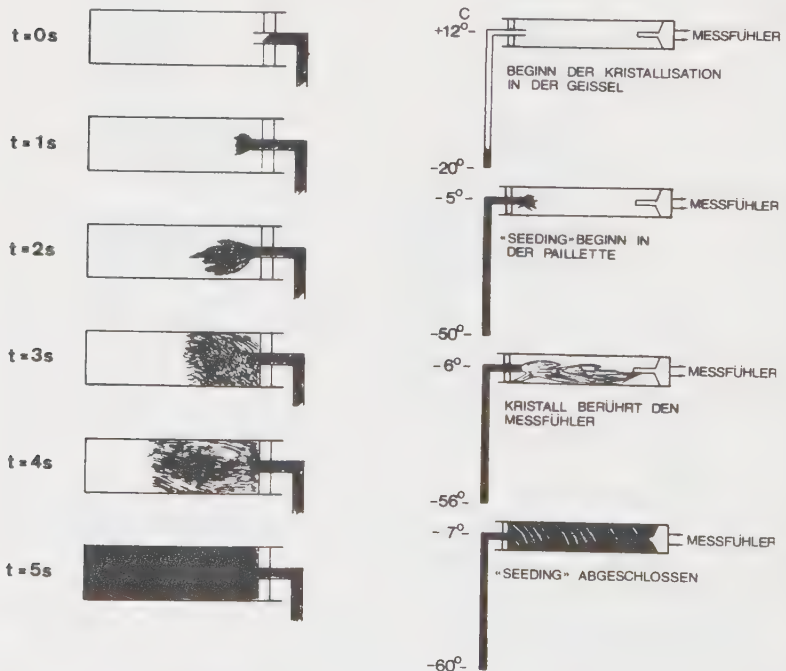


Abb. 4.2.1.1 Selbstseedingvorgänge von ca. 5 Sekunden bzw. 5 Minuten Dauer

Es ist zu erkennen, daß die Kristalle den gesamten Querschnitt des Straws ausfüllen, während sie wachsen. Im Gegensatz dazu bleiben beim sehr langsam ablaufenden Kristallisationsprozeß eisfreie Räume erhalten. Noch beim Abbruch des Tiefgefrierversuches bei -30°C sind zwischen deutlich kristallinen auch klare Bereiche im Medium zu beobachten.

Typisch für alle Selbstseedingvorgänge, die länger als 30 Sekunden dauern, ist die Anordnung der Kristalle im Straw. Diese wachsen offensichtlich schraubenförmig durch das Medium. Durch Apposition und durch das Einwachsen neuer Spiralen in die Zwischenräume werden diese immer enger; die oben beschriebene Struktur bleibt aber erhalten.

4.2.2 Temperaturveränderungen im Medium während der Kristallisation

Registriert man die Temperaturveränderungen in einem Embryocontainer während des Kontaktseedings, so stellt man fest, daß nach einer kurzen Abkühlung die Temperatur auf einen Wert um -4°C steigt und kurzzeitig konstant bleibt. Hier wird nun meist für 10 Minuten auf weitere Abkühlung verzichtet, um den Embryonen eine Äquilibration zu ermöglichen. Beim Selbstseeding fehlt diese initiale Abkühlung und die Temperatur steigt auch praktisch nicht an, da die Regelung Zeit hat, den Wärmeeinbruch durch die Kristallisation zu kompensieren. Das folgende Diagramm vergleicht beide Formen der Kristallisation.

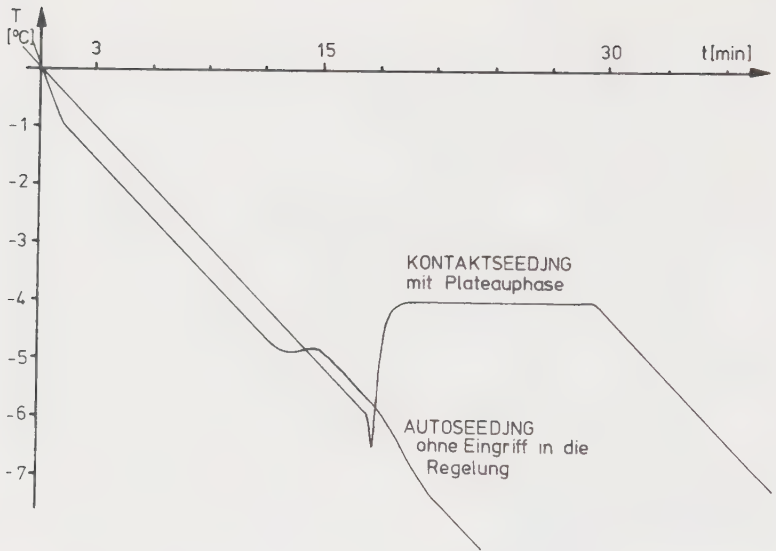


Abb. 4.2.2.1 Temperatur-Zeit-Profile im Seedingbereich beim Kontakt- und Selbstseeding

4.2.3 Die Eisbildung im Medium

Außer bei extrem schnell ablaufenden Autoseedingprozessen geht die Eisbildung im "Erlanger Straw" wesentlich langsamer vor sich, als beim Kontaktseeding. Vor allem bei fast vollständig abgelaufener Kristallisation steigt der Eisanteil bei langsamen Selbstseedingvorgängen pro Zeiteinheit nur noch gering an, was natürlich die Anpassung der Embryonen an die veränderten osmotischen Verhältnisse erleichtert.

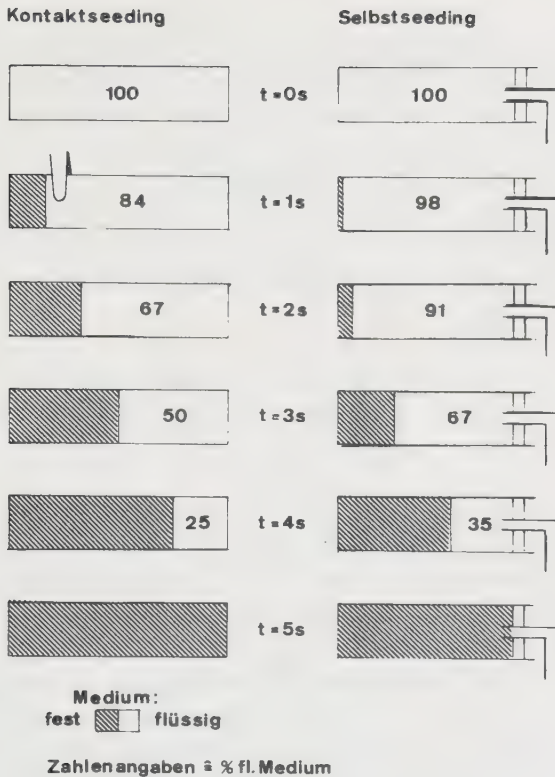


Abb. 4.2.3.1 Eisbildung im Medium

Die Geschwindigkeit, mit der die Eiskristalle den Straw durchwachsen, ist beim "Offenen System" ja sehr einfach optisch bestimmbar. Beim Kontaktseeding und bei sehr schnell ablaufenden Selbstseedingvorgängen kann man nur pauschal von der Geschwindigkeit der Kristalle sprechen, da diese den Straw wie eine "Wand" durchwachsen. Dabei werden Geschwindigkeiten von bis zu 3 cm/sec erreicht. Beim langsam ablaufenden Kristallisationsvorgang kann jedoch beobachtet werden, daß zunächst eine einzelne "Kristallnadel" das Röhrchen durchwächst.

Durch die langsamen Anbauvorgänge kommt es zu einer sehr niedrigen Wachstumsgeschwindigkeit, die minimal 0.2 mm/sec betragen kann. Diese Werte wurden aus der einfachen Beziehung

$$\text{Wachstumsgeschwindigkeit} = \frac{\text{Strawlänge}}{\text{benötigte Zeit}}$$

errechnet, wobei ein monolokaler Kristallisationsbeginn vorausgesetzt wurde.

4.3 Der Einfluß verschiedener Typen des "Erlanger Straw" auf die Kristallisation

Mit einer Reihe statistischer Testverfahren sollte grob orientierend geprüft werden, ob der Kristallisationsvorgang durch die Modifikation der verwendeten Gefriergutbehälter beeinflusst wird.

Da eine Vielzahl verschiedener Fragestellungen an relativ wenigen Fällen untersucht werden mußte, können zwar keine "signifikanten" Ergebnisse vorgestellt werden, es ergeben sich aber interessante Aspekte für weitere Untersuchungen. Einzelheiten zu den Testverfahren sind im statistischen Anhang enthalten.

4.3.1 Der Einfluß verschiedener Embryocontainer

Die vier verwendeten Typen des "Erlanger Straw" zeigten keinen Einfluß auf den Beginn des Kristallisationsvorganges. Auch für seine Dauer war keine Beeinflussung zu erkennen. Freilich lagen nur 5 Exemplare des Types C vor, so daß eine Verallgemeinerung dieser Aussagen nicht möglich erscheint.

4.3.2 Der Einfluß der Anwesenheit von Embryonen im Straw

Wie zu erwarten war, zeigte sich kein Einfluß von Embryonen auf den Beginn der Kristallisation.

Vergleicht man innerhalb der einzelnen Versuchsreihen die Dauer der Eisbildung bei den Straws mit und denen ohne Embryonen, so ergibt sich ebenfalls kein Unterschied.

4.3.3 Die Beeinflussung der Kristallisation durch die Meßfühler

Während der Experimente war der Eindruck entstanden, die Kristallisation beginne in den Straws später, in denen sich ein Meßfühler befindet und sei dort auch von kürzerer Dauer. Dies konnte rechnerisch erhärtet werden.

So ergibt sich für Mittelwert und Standardabweichung (in Klammern) des Kristallisationsbeginnes:

bei Straws ohne Meßfühler	-4.2°C	(1.0°C)
---------------------------	--------	---------

bei Straws mit Meßfühler	-4.8°C	(1.5°C)
--------------------------	--------	---------

Entsprechend läßt sich für die Kristallisationsdauer errechnen:

Straws ohne Meßfühler	9.31 min	(8.34 min)
-----------------------	----------	------------

Straws mit Meßfühler	5.62 min	(6.06 min)
----------------------	----------	------------

Trotz der großen Streuung, die zum Teil auf die Versuchsanordnung zurückzuführen ist, ist eine deutliche Differenz beider Gruppen erkennbar.

Die Ursache des "verspäteten" Beginns der Kristallisation in den Meßfühlerstraws dürfte darin zu suchen sein, daß der verwendete Thermofühler, der als Widerstandsmesser arbeitet, zu einer gewissen Erwärmung des Mediums durch den fließenden Strom beiträgt.

Da der PT100 Meßfühler etwa 20 mm weit in das Plastikröhrchen hineinragt, wird die freiwerdende Kristallisationswärme schon

bald registriert, was den Regler dazu veranlaßt, den Kühlbehälter anzuheben. Dies wiederum führt zu einer schnellen Beendigung der Kristallisation, was teilweise die kürzere Eisbildungsdauer in den Straws mit Meßfühlern erklärt.

4.4 Die Bedeutung eines Eingriffes in die Regelung für den Selbstseedingvorgang

Es ist unmittelbar einleuchtend, daß jeder Eingriff in die automatische Regelung eine Störung des vorgegebenen Gefrierprofils darstellen kann und somit auch eine Beeinflussung des Kristallisationsprozesses möglich ist. Hier muß also nur untersucht werden, ob ein kurzzeitiges "Anhalten" der Regelung, wie es z.B. nötig ist, um ein Kontaktseeding im Kamin der Gefrieranlage vornehmen zu können, die Kristallisation der selbstseedenden Straws stört.

Erwartungsgemäß wird der Beginn der Kristallisation nicht beeinflusst, da die Regelung bei der gewählten Versuchsanordnung erst dann inaktiviert wurde, wenn das Selbstseeding schon begonnen hatte.

Die deutlich längere Kristallisationsdauer ist auf die Versuchsanordnung zurückzuführen, die beim Eingriff in die Regelung ein zehnminütiges "Plateau" (d.h. keine weitere Abkühlung) vorsah.

4.5 Die Wirkung verschiedener Kühlraten

Als letzter der versuchsabhängigen Parameter wurde die Wirkung der verwendeten Kühlraten auf den Ablauf der Kristallisation untersucht. Beurteilbar sind dabei jedoch nur die Kühlgeschwindigkeiten von -0.10 K/min und -0.30 K/min, da nur hier ausreichende Beobachtungszahlen vorliegen. Betrachtet man die Temperatur, bei der die Kristallisation begann, so ergibt sich kein Einfluß der Kühlrate. Die Dauer der Eisbildung wird jedoch durch die Kühlrate beeinflusst, was wiederum experimentell bedingt ist, da lange Kristallisationszeiten eben nur bei kleinen Kühlraten erreichbar sind.

4.6 Der Beginn der Kristallisation

Als Kristallisationsbeginn wurde der Zeitpunkt definiert, an dem die ersten Kristalle von der inneren Geißelmündung aus in den Straw einzuwachsen beginnen.

Betrachtet man die gesamte Stichprobe, so ergibt sich ein mittlerer Kristallisationsbeginn bei -4.4 °C (268.6K), der Medianwert liegt bei -4.0 °C (269K), wobei die Maxima bei -1.9 °C (271.1K) und -8.6 °C (264.4K) liegen. Statistische Untersuchungen zeigten, daß weder die Kühlrate noch andere Parameter der Versuchsanordnung den Seedingbeginn zu beeinflussen vermochten, so daß alle Werte einer Grundgesamtheit zu entstammen scheinen. Die folgenden Strichdiagramme sollen dies am Beispiel der Kühlrate verdeutlichen.

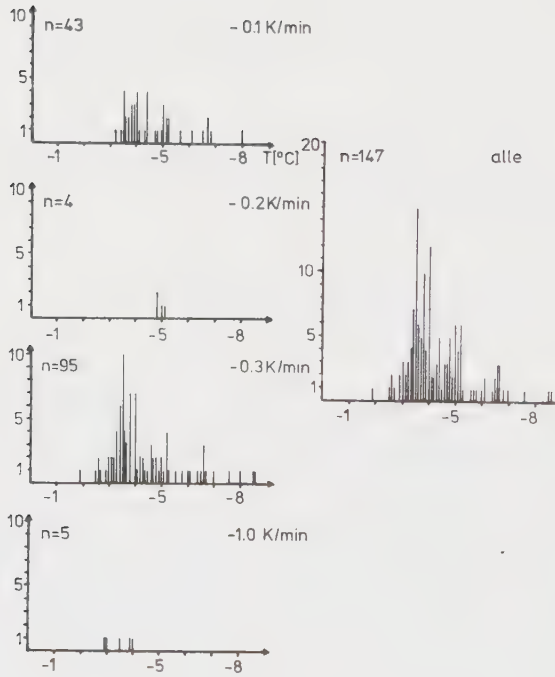


Abb. 4.6.1 Verteilung des Kristallisationsbeginns, auf-
gliedert nach Kühlraten

Es wird deutlich, daß für die Kühlraten -0.2 und -1.0 K/min nur sehr wenige Fälle vorhanden sind, wobei beide Gruppen innerhalb des Intervalles liegen, das von den Teilstichproben gebildet wird, die durch die Kühlraten -0.1 und -0.3 K/min bestimmt werden. Die Kenngrößen der vier Gruppen sind:

Kühlrate K/min	Mittelwert des Kristall.beg.	Standardab- weichung °C	Median
-0.1	- 4.6	1.1	- 4.3
-0.2	- 4.9	0.2	- 4.8
-0.3	- 4.3	1.4	- 3.9
-1.0	- 3.4	0.5	- 3.5

4.7 Die Kristallisationsdauer

Da die Kristallisationsdauer eine der Variablen im Versuchsaufbau war, ist nicht zu fragen, ob sie von den anderen Parametern beeinflußt wurde, sondern wie gut sie steuerbar war. Es ist schon angeklungen, daß die Dauer des Seedingvorganges in weiten Grenzen schwankte, wobei der kleinste Wert drei Sekunden und der größte 30 Minuten betrug. Es sollten folgende Kristallisationszeiten erreicht werden:

* Gruppe 1

Kurzseeding entsprechend dem Kontaktseeding mit einer Kristallisationsdauer von 5 bis zu 30 Sekunden

* Gruppe 2

kurze Kristallisation von drei bis zu etwa sieben Minuten

* Gruppe 3

sehr langsame Kristallisation, die 20 bis 30 Minuten dauerte.

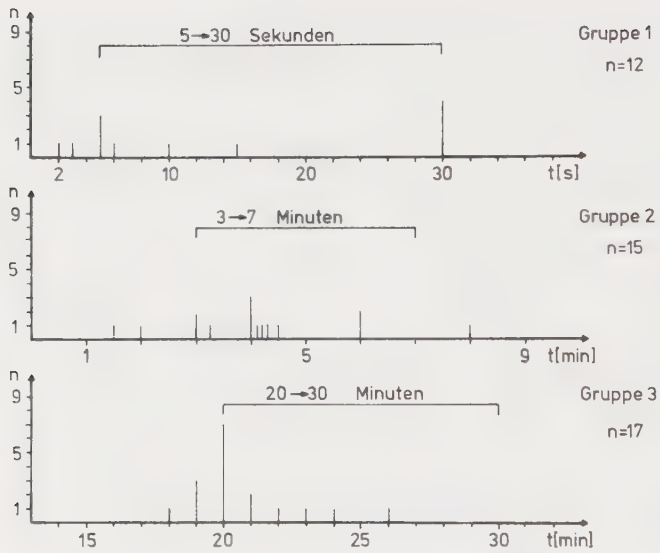


Abb. 4.7.1 Übereinstimmung der beabsichtigten und der tatsächlich erreichten Kristallisationsdauer

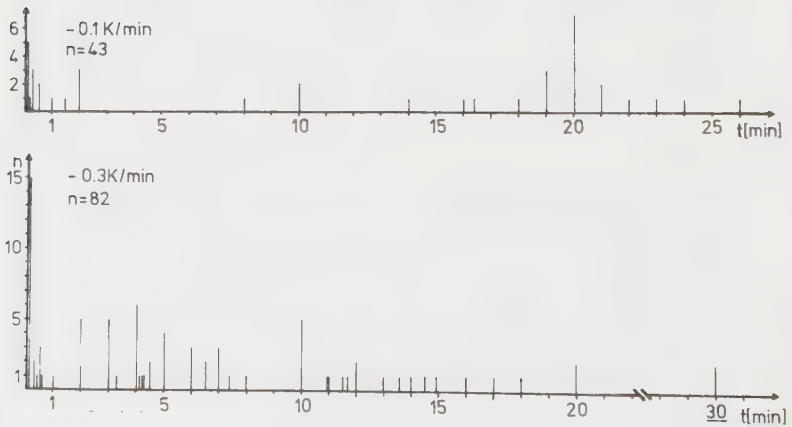


Abb. 4.7.2 Einfluß der Kühlrate auf die Kristallisationsdauer

4.8 Die Zuverlässigkeit des Selbstseedings

Insgesamt wurden 147 Straws untersucht. In keinem Fall kam es zu einem Ausbleiben der spontanen Kristallisation, was dafür spricht, daß das System 100% zuverlässig arbeitet. Betrachtet man aber die große Streuung der Temperatur, die von einem Kristallisationsbeginn bei -1.9°C bis zu -8.6°C reicht, so fragt man nach den Ursachen dieser Variabilität. Neben der Möglichkeit, daß Fehler bei der Registrierung oder Ablesung der Temperatur eine Rolle beim Zustandekommen dieser Streuung spielen, muß vor allem diskutiert werden, ob nicht zufällig vorliegende besonders günstige oder besonders ungünstige Molekülstrukturen im Medium vor der inneren Geißelmündung für derartige Effekte verantwortlich sind.

Insgesamt kann das verwendete Seedingverfahren als ausreichend zuverlässig bewertet werden.

4.9 Die Reproduzierbarkeit der Gefriervorgänge

Wie schon im Abschnitt 3.6.3 dargestellt, arbeitet die verwendete Gefriereinrichtung mit einer Regelgenauigkeit von $\pm 0.1\text{K}$. Dieser im Labor ermittelte Wert läßt erwarten, daß die Reproduzierbarkeit der Tiefgefriervorgänge mit der CTE 8000 sehr gut ist, d.h. verschiedene Untersucher sollten beliebige Experimente mit gleichen Ergebnissen wiederholen können. Diese Aussage in der Praxis nachzuvollziehen, fällt aber außerordentlich schwer, da jeweils nur wenige Experimente mit völlig gleichem Versuchsaufbau durchgeführt werden und Daten eines zweiten Experimentators noch gar nicht vorliegen. In der Literatur wird der Frage reproduzierbarer Tiefgefriervorgänge keine Beachtung geschenkt. Lediglich LEHN-JENSEN und GREVE, sowie POKORNY (92, 167) beschäftigen sich mit dem Problem.

Was dort aber Reproduzierbarkeit genannt wird, ist eigentlich die Zuverlässigkeit der jeweils verwendeten Gefriereinrichtung, d.h. es wird ein Vergleich der vorgegebenen und der tatsächlich erreichten Kühlraten durchgeführt. Die dabei gewählte Methode der Betrachtung von Mittelwerten ist allerdings nicht befriedigend, da sie eventuelle Differenzen nicht aufzeigt, sondern sie im Gegenteil verwischt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Mittel des graphischen Vergleiches gewählt, wobei die interessanten Bereiche der Temperatur-Zeit-Diagramme der Versuche übereinandergezeichnet wurden.

Abgesehen von versuchsbedingten Verschiebungen erwiesen sich die Schreiberkurven außerhalb des Kristallisationsbereiches als praktisch identisch. Während des Seeding werden die größten Anforderungen an die Regelung gestellt, da es gilt, die freiwerdende Kristallisationsenergie abzufangen.

Wie die nachfolgende Darstellung zeigt, gelingt das immer dann ideal, wenn der Meßfühlerstraw waagrecht steht, d.h. die Versuchsanordnung den Ablauf der Kristallisation im Reglerstraw nicht behindert.

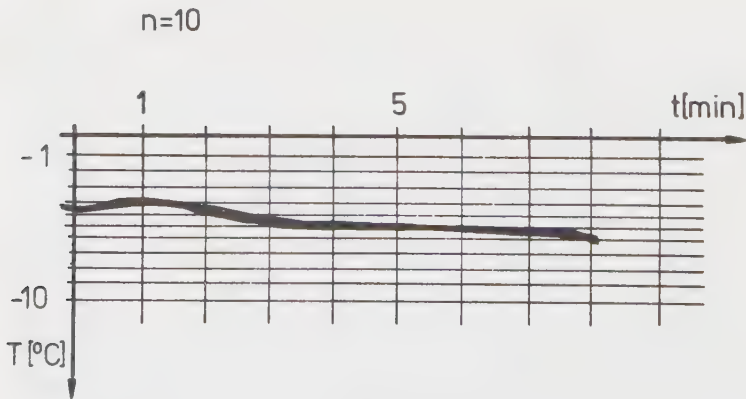


Abb. 4.9.1 Temperaturverlauf im Kristallisationsbereich

Bei den Versuchen, die eine Variation der Kristallisationsdauer zum Ziel hatten, war die Stellung des Meßfühlerstraws notwendigerweise nicht ideal für den Ablauf des Seeding in ihm, damit das Seeding in den Straws, die mit Embryonen beschickt waren, optimal ablaufen konnte. Dies spiegelt sich in den unten dargestellten Temperatur-Zeit-Kurven wieder.

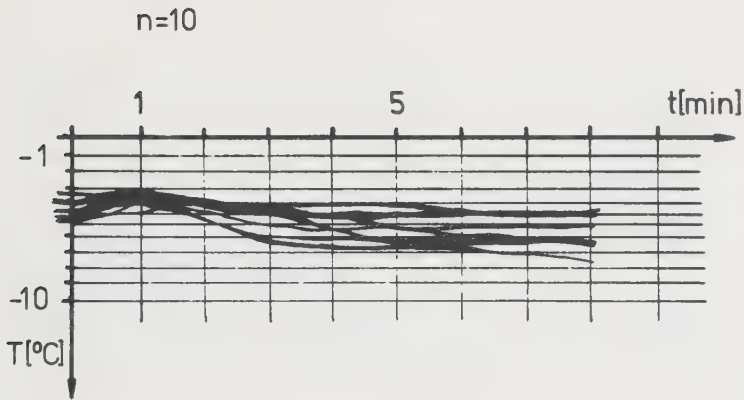


Abb. 4.9.2 Temperaturverlauf im Seedingbereich bei
"ungünstiger" Versuchsanordnung

Deutlich ist die größere Streuung und die stärkere Erwärmung zu erkennen, die dadurch entsteht, daß nach dem Einsetzen der Reglerbewegung plötzlich größere Mediummengen auskristallisieren. Vergegenwärtigt man sich aber, daß bei den dargestellten Experimenten die Versuchsanordnung aus technischen Gründen nicht konstant gehalten werden konnte, ergibt sich doch eine befriedigende Homogenität der Temperatur-Zeit-Kurven, die nur für die Reglerstraws gelten. Das Seeding in den Embryocontainern verläuft wie in Abbildung 4.9.1 dargestellt, da diese ja optimal auskristallisieren können.

Die Reproduzierbarkeit der Tiefgefriervorgänge mit der CTE 8000 ist somit noch nicht endgültig zu beurteilen. Die Zuverlässigkeit der Maschine kann jedoch in Bezug auf das Selbstseeding als hundertprozentig, in Bezug auf das Erreichen und Einhalten beliebiger Temperaturprofile als jenseits der Meßgenauigkeit üblicher Temperatur-Schreiber liegend beurteilt werden. Lediglich im Bereich des Selbstseeding sind die beobachteten Differenzen größer, bei idealem Seedingverlauf jedoch vernachlässigbar.

5 Die Kryokonservierung von Mäuseembryonen

Im vorausgehenden Kapitel konnte dargelegt werden, daß die willkürlich veränderten Versuchsbedingungen weder die Dauer noch den Beginn der Kristallisation zu beeinflussen vermochten. Da somit auch eine Auswirkung auf die Embryonalqualität ausgeschlossen ist, kann bei der folgenden Darstellung der Kryokonservierungsversuche auf eine weitere Diskussion dieser Parameter verzichtet werden.

5.1 Vorversuche

In 12 Tiefgefrierversuchen mit der im Abschnitt 2.2.6.2 beschriebenen Anlage wurden 349 Morulae und Blastozysten in der bei 3.3 dargestellten Weise eingefroren. 317 Embryonen (90.8%) konnten wiedergefunden werden.

Neben dem Zweck, die Manipulation mit dem Tiermaterial zu erlernen, dienten diese Versuche in erster Linie dazu, Kriterien zur morphologischen Beurteilung der Embryonen zu erarbeiten.

Das Ergebnis waren die im Kapitel 3.4 vorgestellten Qualitätsstufen.

Als morphologisch intakt wurden in den folgenden "Hauptversuchen" nur diejenigen Embryonen bewertet, die ihre Qualitätsstufe beibehalten hatten. Als nicht intakt galten sie z.B. schon dann, wenn Embryonen der Qualitätsstufe 1 nach dem Auftauen und Ausverdünnen des DMSO der Stufe 2 oder 3 zugeordnet werden mußten, obwohl sich im Verlauf der Kultivierung solcher Embryonen häufig zeigte, daß ihre Vitalität in keiner Weise beeinträchtigt war.

5.2 Erste Versuchsreihe

Vergleich zwischen dem Kontakt- und dem Selbstseeding

Die Versuche dieser Reihe wurden von Juli bis September 1981 durchgeführt. Insgesamt 579 Embryonen wurden in 10 Einzelexperimenten eingefroren.

5.2.1 Der spezielle Versuchsaufbau

Die vier Embryocontainer jedes Versuches, die nebeneinander auf den Strawträger der Gefrieranlage gebracht wurden, bestanden aus je zwei handelsüblichen "mini-tüb"-Röhrchen und zwei "Erlander Straws".

In dem Augenblick, in dem der Mediumkristall den Meßfühler berührte, reagierte die Regeleinheit und am Schreiber war eine geringe Erwärmung zu sehen. Jetzt wurde die Regelung "angehalten" (siehe 3.6.2.3) und die beiden Straws ohne Geißel mit der Pinzette geseedet. Für zehn Minuten unterblieb eine weitere Abkühlung, bevor der Gefriervorgang fortgesetzt und beim Erreichen von -30°C alle Straws in flüssigen Stickstoff umgesetzt wurden.

Nach einer Lagerungszeit von einem bis zu zehn Tagen wurden sie gemeinsam aufgetaut und die Embryonen kultiviert. Beim Transfer wurden in je ein Uterushorn des Empfängertieres Embryonen aus den Straws, die einem Kontaktseeding unterworfen waren und aus selbstseedenden Straws gebracht.

Das folgende Diagramm zeigt einen Ausschnitt aus dem Kühlprofil dieser Versuchsreihe, in das der Zeitpunkt des Kontaktseedings eingetragen wurde.

TEMPERATUR-ZEIT-PROFIL I.VERSUCHSREIHE (AUSSCHNITT)

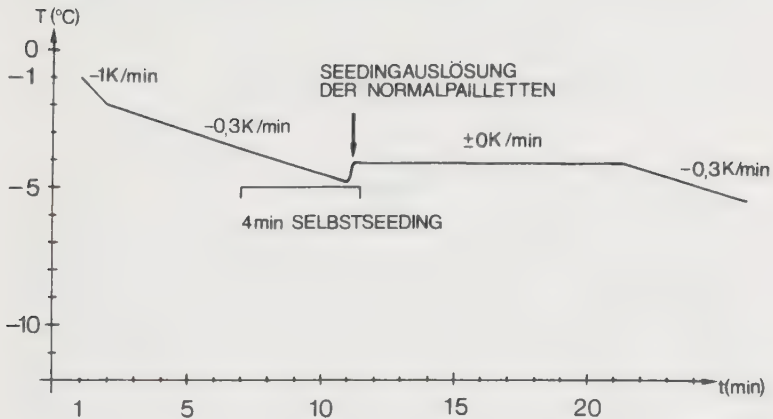


Abb. 5.2.1 Temperatur-Zeit-Profil der ersten Versuchsreihe

Bis 0°C betrug die Kühlrate $-2,0\text{ K/min}$, nach dem Seedingplateau bis zur Endtemperatur von -30°C betrug sie $-0,3\text{ K/min}$.

5.2.2 Ergebnisse

Die Reaktionen der verschiedenen Entwicklungsstufen sind im Kapitel 5.4 gesondert dargestellt. Eine Gegenüberstellung mit der zweiten Versuchsreihe und eine graphische Darstellung folgt im Abschnitt 5.5.

Beschreibungen der statistischen Verfahren und ausführliche Tabellen sind im Anhang nachzuschlagen.

5.2.2.1 Der Vergleich der Wiederfindungsrate

Zunächst wurde die Wiederfindungsrate nach dem Auftauen der handelsüblichen "mini-tüb"-Röhrchen und der "Erlanger Straws" miteinander verglichen.

Tab. 3 Wiederfindungsrate der 1. Versuchsreihe

Seeding	Embryonen		
	eingefroren n (%)	wiedergefunden n (%)	verloren n (%)
Kontakt	266 (100)	252 (94.7)	14 (5.3)
Selbst	313 (100)	293 (93.6)	20 (6.4)
gesamt	579 (100)	545 (94.1)	43 (5.9)

Wie schon auf Grund der obigen Tabelle zu erwarten, ergibt sich im Chi - Quadrat - Test kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

5.2.2.2 Der Anteil morphologisch intakter Embryonen

Vergleicht man dagegen die Anzahl der Embryonen jeder Gruppe, die den Tiefgefriervorgang unbeschadet überstanden haben, so zeigt sich ein deutlich besseres Abschneiden der Embryonen, die einem schonenden Selbstseeding unterzogen wurden.

Tab. 4 Anteil morphologisch intakter Embryonen der 1. Versuchsreihe

Seeding	Embryonen		
	wiedergefunden n (%)	davon intakt n (%)	geschädigt n (%)
Kontakt	252 (100)	122 (48.4)	130 (51.6)
Selbst	293 (100)	190 (64.8)	103 (35.2)
gesamt	545 (100)	312 (57.2)	233 (42.8)

Die beiden Gruppen unterscheiden sich mit p kleiner 0.001 hoch signifikant. Wie noch dargestellt wird (5.4), gehen die hohen Verluste dieser Versuchsreihe vor allem auf die Expandierten Blastozysten zurück, die von anderen Autoren meist nicht zur Kryokonservierung verwendet werden.

5.2.2.3 Die Weiterentwicklung in vitro

Es wurden, wie bei allen Kryokonservierungsversuchen, nicht nur die morphologisch intakten, sondern alle Embryonen kultiviert, für die keine Empfängertiere zur Verfügung standen. Die hohen Verluste sind, wie leider erst später durchgeführte Untersuchungen zeigten, darauf zurückzuführen, daß das verwendete HAMS F10 - Medium unter Paraffinöl im Mikrotropfen nicht pH-stabil war. Deswegen erfolgte die Kultivierung bei den späteren Versuchsreihen ausschließlich in PBS mit 10% FCS. Die unten dargestellten Ergebnisse lassen sich somit mit der 2. Versuchsreihe nicht vergleichen. Dagegen zeigt die statistische Auswertung, daß sich die beiden Gruppen der ersten Versuchsreihe wiederum hochsignifikant voneinander unterscheiden.

Tab. 5 in vitro-Weiterentwicklung, 1. Versuchsreihe

Seeding	Embryonen		
	kultiviert n (%)	weiterentw. n (%)	abgestorben n (%)
Kontakt	192 (100)	32 (16.7)	160 (83.3)
Selbst	215 (100)	70 (32.6)	145 (67.4)
gesamt	407 (100)	102 (25.1)	305 (74.9)

5.2.2.4 Die Transferergebnisse

In der folgenden Tabelle sind nur die Werte für trächtige Empfänger wiedergegeben. Die ausführliche Darstellung der Ergebnisse ist im Anhang (8.5.2.2.4) enthalten.

Tab. 6 Transferergebnisse 1. Versuchsreihe, für trächtige Empfänger

Seeding	Embryonen transferiert		Implantationen		Lebende Junge	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Kontakt	60	(100)	31	(51.7)	23	(38.3)
Selbst	76	(100)	42	(55.3)	25	(32.9)
gesamt	136	(100)	73	(53.7)	48	(35.3)

Weder die Implantationsrate, noch die Anzahl der geworfenen Jungen unterscheidet sich signifikant.

Dieses Ergebnis überrascht nicht weiter, da jeweils nur die besten Embryonen jeder Gruppe zum Transfer verwendet wurden.

5.3 Die zweite Versuchsreihe

Vergleich verschieden langer Kristallisationszeiten beim Selbstseeding

Die einzelnen Experimente dieser Versuchsreihe wurden im Zeitraum von Dezember 1981 bis März 1982 durchgeführt.

5.3.1 Der spezielle Versuchsaufbau

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, wie sich unterschiedlich lange Kristallisationsvorgänge auf die Überlebensraten der Embryonen auswirken. Dazu war es notwendig, durch die Manipulation der Anordnung von Reglerstraw und Embryocontainern zueinander die Seedingdauer zu beeinflussen. Durch Anordnung des Röhrchens mit dem 1. Meßfühler über oder unter der Ebene der restlichen Straws konnte erreicht werden, daß die Kristallisation in dem zur Regelung benutzten Straw nach oder vor den anderen Straws begann. Da die Regleraktion aber die Kristallisation in allen Straws sehr schnell beendet, konnte der Seedingprozeß sehr kurz gehalten (unter 5 Sekunden) oder sehr lange ausgedehnt (bis zu 30 Minuten) werden. Die besonderen Schwierigkeiten liegen bei dieser Versuchsanordnung darin, daß die Kristallisation in den Straws nicht zu einem festen Zeitpunkt einsetzt (siehe 4.2) und auch ihr Ablauf bestimmten Schwankungen unterworfen ist. Die notwendige Temperaturdifferenz kann also nur geschätzt werden. Ein weiteres Problem liegt darin, daß dieser Temperaturunterschied nicht konstant ist (siehe 3.6.1) und auch nicht zu groß sein darf, um die korrekte Temperaturführung der Embryocontainer nicht zu gefährden. Die Mediumtemperatur in diesen Straws wurde durch den 2. Meßfühler registriert, der sich stets auf der selben Ebene befand. Die folgende Abbildung stellt das verwendete Gefrierprogramm vor.

TEMPERATUR-ZEIT-PROFIL II. VERSUCHSREIHE (AUSSCHNITT)

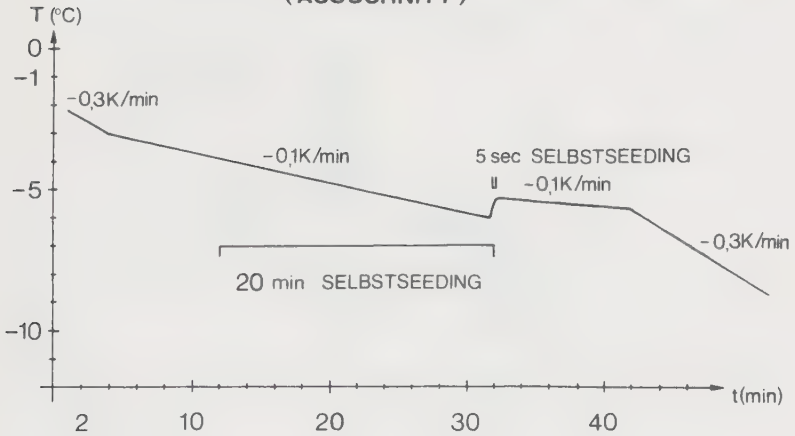


Abb. 5.3.1.1 Das Temperatur-Zeit-Diagramm der 2. Versuchsreihe

Wie bei der ersten Versuchsreihe betrug die Kühlrate bis 0°C -2 K/min und von 0 bis -1°C -1 K/min , im Gegensatz dazu wurde jedoch nicht in den Gefriervorgang eingegriffen.

Die Abbildung auf der folgenden Seite soll den Versuchsaufbau verdeutlichen.

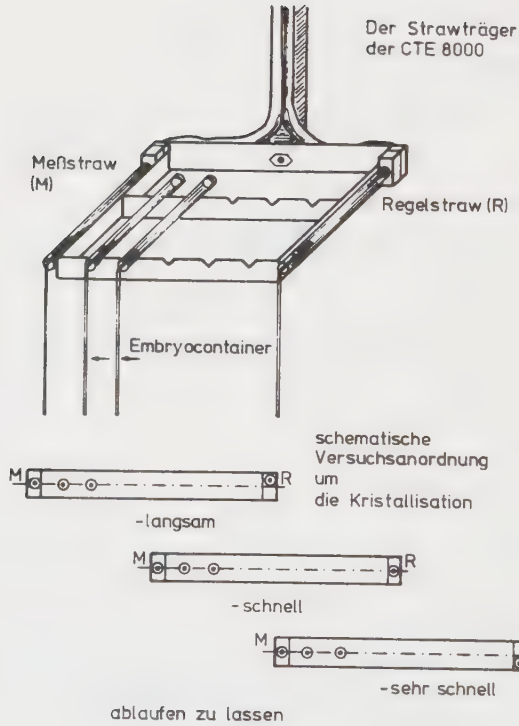


Abb. 5.3.1.2 Der Versuchsaufbau der 2. Versuchsreihe

Aus den oben genannten Gründen ist es nicht möglich, drei exakte Kristallisationszeiten für die drei Versuchsgruppen anzugeben, sondern es müssen Zeitbereiche genannt werden.

Tab. 7 Zeitbereiche der Kristallisationsdauer bei der 2. Versuchsreihe

Versuchsgruppe	2A	2B	2C
Anzahl der Straws	12	15	17
Dimension	sec	min	min
mittlere Seedingdauer	14.25	4.13	20.71
Median	8.0	4.0	20.0
Minimum	2.0	1.5	18.0
Maximum	30.0	8.0	26.0
Standardabweichung	12.11	1.63	2.02

Die drei deutlich getrennten Gruppen entsprechen einer kurzen, dem Kontaktseeding vergleichbaren Kristallisationsdauer, einer mittleren und einer sehr langen, wobei mit 26 Minuten noch keineswegs die maximale Seedingdauer erreicht ist.

5.3.2 Ergebnisse

Wie im Abschnitt 5.2.2 soll auch hier nur ein tabellarischer Überblick über die Stichprobe gegeben werden.

5.3.2.1 Die Wiederfindungsrate

Der Vollständigkeit halber sei auch bei dieser Versuchsreihe die Wiederfindungsrate aufgeführt. Die Gruppen unterscheiden sich erwartungsgemäß nicht signifikant voneinander, die Werte für Chi-Quadrat und p sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 8 Wiederfindungsrate der 2. Versuchsreihe

Gruppe	Embryonen		
	eingefroren n (%)	wiedergefunden n (%)	verloren n (%)
2 A	246 (100)	237 (96.3)	9 (3.7)
2 B	269 (100)	253 (94.1)	16 (5.9)
2 C	278 (100)	254 (92.9)	24 (8.6)
gesamt	793 (100)	744 (93.8)	49 (6.2)

5.3.2.2 Der Anteil morphologisch intakter Embryonen

Vergleicht man die Ergebnisse der morphologischen Beurteilung nach dem Auftauen miteinander, so ergibt sich ein Chi-Quadrat-Wert von 13.71 und mit p kleiner 0.01 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Dabei unterscheiden sich die beiden ersten Gruppen nicht voneinander, jedoch deutlich von den Embryonen, die einem langsamen Selbstseedingvorgang unterzogen wurden.

Tab. 9 Anteil morphologisch intakter Embryonen, 2. Versuchsreihe

Gruppe	Embryonen		
	wiedergefunden n (%)	davon intakt n (%)	geschädigt n (%)
2 A	237 (100)	163 (68.8)	74 (31.2)
2 B	253 (100)	183 (72.3)	70 (27.7)
2 C	254 (100)	210 (82.7)	44 (17.7)
gesamt	744 (100)	556 (74.7)	188 (25.3)

5.3.2.3 Die in vitro Weiterentwicklung

Da die Kultivierung der Embryonen in der zweiten Versuchsreihe in PBS erfolgte, sind die Ergebnisse nur untereinander, nicht jedoch mit der ersten Versuchsreihe vergleichbar. Wiederum wurden alle Embryonen, gleich welcher Qualitätsstufe, kultiviert.

Tab. 10 in vitro Entwicklung, 2. Versuchsreihe

Gruppe	Embryonen			
	kultiviert	weiterentw.	abgestorben	
	n (%)	n (%)	n (%)	
2 A	181 (100)	108 (59.7)	73 (40.4)	
2 B	185 (100)	102 (55.1)	83 (44.9)	
2 C	181 (100)	113 (62.4)	68 (37.6)	
gesamt	547 (100)	323 (59.1)	224 (40.9)	

Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen, wenn man alle Embryonalstadien gemeinsam betrachtet.

5.3.2.4 Die Transferergebnisse

Auch bei der zweiten Versuchsreihe werden nur die Daten für tragende Empfänger dargestellt. Die ausführlichen Tabellen können im Anhang (8.5.3.2.4) nachgesehen werden.

Tab. 11 Transferergebnisse der 2. Versuchsreihe für trüchtige Empfängertiere

Gruppe	Embryonen transferiert n (%)	Implantationen n (%)	Lebende Junge n (%)
2 A	43 (100)	27 (62.8)	4 (9.3)
2 B	49 (100)	22 (44.9)	6 (12.2)
2 C	73 (100)	46 (63.0)	18 (24.7)
gesamt	165 (100)	95 (57.6)	28 (17.0)

Weder für die Implantationsrate, noch für die Anzahl der geworfenen Jungen läßt sich ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied nachweisen.

Der sehr geringe Anteil geworfener Jungen bei gleichzeitig hoher Implantationsrate ist wohl auf die ungünstigen jahreszeitlichen Verhältnisse im Versuchszeitraum (Herbst und Winter) zurückzuführen.

5.4 Gegenüberstellung der verschiedenen Embryonalstadien

Im folgenden Abschnitt werden die beiden Versuchsreihen dahingehend untersucht, ob der Kristallisationsvorgang auf die untersuchten Embryonalstadien unterschiedliche Auswirkungen hat. Da die Versuchsanordnung eine Bestimmung der Implantationsraten der einzelnen Stadien nicht erlaubte, erübrigt sich auch eine Darstellung der Transferergebnisse in diesem Kapitel. Auch ist auf eine vollständige Wiedergabe aller Werte in den Tabellen verzichtet worden, um die Übersichtlichkeit zu erhalten. Der Interessierte sei auf den statistischen Anhang verwiesen.

5.4.1 Ergebnisse der ersten Versuchsreihe

Im folgenden werden die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe nach den Embryonalstadien aufgeschlüsselt. Dabei wird für jedes Stadium getrennt das Kontakt- mit dem Selbstseeding verglichen und gleichzeitig untersucht, ob die Embryonen unterschiedlicher Entwicklung die Kristallisation gleich gut überstehen. Tabellen zu dieser Frage sind jedoch nur im statistischen Anhang enthalten.

Eine statistische Auswertung der folgenden Tabelle ergibt, daß sich Embryonen verschiedenen Alters, die einem Kontaktseeding unterworfen waren, in ihrer Qualität nach dem Auftauen schwach signifikant, in der in vitro Entwicklung dagegen signifikant unterscheiden.

Beim Selbstseeding ergibt sich sowohl bei der morphologischen Beurteilung als auch bei der Entwicklung in der Kultur ein hoch signifikanter Unterschied (p kleiner 0.001).

Tab. 12 Ergebnisse der ersten Versuchsreihe, aufgeschlüsselt
nach Embryonalstadien

Embryonalstadium	Seeding	Embryonen wiedergefunden		davon morphologisch intakt		Embryonen kultiviert		davon weiterent- wickelt	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Morula	Kontakt	140	100	79	56.4	101	100	16	15.8
	Selbst	149	100	123	82.6	100	100	34	34.0
Junge Blastozyste	Kontakt	32	100	21	65.6	24	100	10	41.7
	Selbst	60	100	49	81.7	32	100	24	75.0
Blastozyste	Kontakt	40	100	14	35.0	31	100	5	16.1
	Selbst	36	100	14	38.9	35	100	12	34.3
Expandierte Blastozyste	Kontakt	40	100	8	20.0	36	100	1	2.7
	Selbst	48	100	4	8.3	48	100	0	0.0
alle	Kontakt	252	100	122	48.4	192	100	32	16.7
	Selbst	293	100	190	64.8	215	100	70	32.6

Vergleicht man nun Selbst- und Kontaktseeding miteinander, so ergibt sich zunächst ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, sowohl in der morphologischen Beurteilung als auch bei der kulturellen Entwicklung. Da sich jedoch nur bei den Morulae ein deutlicher statistischer Unterschied innerhalb der Stadien sichern läßt, scheint dabei die unterschiedliche Reaktion der Embryonalstadien den Effekt der verschiedenen Kristallisationsauslösung zu überdecken. Allerdings ist zu bedenken, daß in den anderen Gruppen wesentlich weniger Embryonen zur Verfügung standen, als bei den Morulae.

Es zeigt sich deutlich, daß Morulae und Junge Blastozysten die Kryokonservierung besser überstehen als die älteren Embryonalstadien. Beachtenswert im Hinblick auf die zweite Versuchsreihe ist das extrem schlechte Ergebnis der Expandierten Blastozysten.

5.4.2 Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe

Die folgende Tabelle macht deutlich, daß wiederum die jüngeren Embryonen durch den Tiefgefriervorgang weniger geschädigt werden, als die späten Blastozystenstadien. Es sei schon hier auf die relativ sehr guten Ergebnisse beim sehr langen Kristallisationsprozeß (2 C) hingewiesen, wo auch Blastozysten noch zu ca. 81% in vitro Entwicklung zeigten, also "schlüpfen".

Tab. 13 Ergebnisse der 2. Versuchsreihe, aufgeschlüsselt nach Embryonalstadien

Embryonalstadium	Reihe	Embryonen wiedergefunden		davon morphologisch intakt		Embryonen kultiviert		davon weiterent- wickelt	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Morula	2 A	104	100	82	78.8	73	100	45	61.6
	2 B	110	100	95	86.4	73	100	49	67.1
	2 C	98	100	95	96.6	59	100	32	54.2
Junge Blastozyste	2 A	70	100	63	90.0	45	100	38	84.4
	2 B	70	100	61	87.1	39	100	31	79.5
	2 C	82	100	77	93.9	49	100	40	81.6
Blastozyste	2 A	32	100	17	53.1	32	100	21	65.6
	2 B	48	100	23	47.9	48	100	15	31.3
	2 C	33	100	21	63.6	32	100	26	81.3
Expandierte Blastozyste	2 A	31	100	1	3.2	31	100	4	12.9
	2 B	25	100	4	16.0	25	100	7	28.0
	2 C	41	100	15	41.5	41	100	15	36.6
alle	2 A	237	100	163	68.8	181	100	108	59.7
	2 B	253	100	183	72.3	185	100	102	55.1
	2 C	254	100	210	82.7	181	100	113	62.4

Untersucht man die Tabelle 13 daraufhin, ob die Unterschiede in den einzelnen Zellen zufallsbedingt sind, so zeigt sich, daß sich die Gruppen sowohl in der morphologischen Beurteilung nach dem Auftauen als auch in der kulturellen Weiterentwicklung hoch signifikant unterscheiden. Innerhalb der Stadien läßt sich jedoch nur bei den Gruppen der Blastozysten und der Expandierten Blastozysten ein deutlicher Unterschied herausarbeiten. Wenn auch die Fallzahl in der Gruppe der Expandierten Blastozysten recht klein ist, so scheint der sehr langsame Kristallisationsvorgang der Versuchsgruppe 2 C erstmals die Möglichkeit zu bieten, erwähnenswerte Überlebensraten bei der Kryokonservierung älterer Embryonen zu erhalten.

5.4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der ersten und der zweiten Versuchsreihe

In diesem Kapitel soll ein Vergleich zwischen den beiden Versuchsreihen angestellt werden, wenn er sich bedauerlicherweise auch auf die morphologische Beurteilung der Embryonen nach dem Auftauen beschränken muß.

Die Tabelle 14 enthält nur die nötigsten Angaben, da die ausführlichen Tabellen in den vorhergehenden Abschnitten und im Anhang enthalten sind, wo auch die Chi-Quadrat-Werte dokumentiert wurden.

Tab 14 Ergebnisse der 1. und 2. Versuchsreihe, aufgeschlüsselt nach Stadien

Embryonal- stadium	Versuchs- reihe	Embryonen	
		wiedergefunden (entspr. 100%)	morphologisch intakt n (%)
Morula	1 Kontakt	140	79 (56.4)
	1 Selbst	149	123 (82.6)
	2 A	104	82 (78.8)
	2 B	110	95 (86.4)
	2 C	98	95 (96.6)
	alle	601	474 (78.9)
Junge Blastozyste	1 Kontakt	32	21 (65.6)
	1 Selbst	60	49 (81.7)
	2 A	70	63 (90.0)
	2 B	70	61 (87.1)
	2 C	82	77 (93.9)
	alle	314	271 (86.3)
Blastozyste	1 Kontakt	40	14 (35.0)
	1 Selbst	36	14 (38.9)
	2 A	32	17 (53.1)
	2 B	48	23 (47.9)
	2 C	33	21 (63.6)
	alle	189	89 (47.1)
Expandierte Blastozyste	1 Kontakt	40	8 (20.0)
	1 Selbst	48	4 (8.3)
	2 A	31	1 (3.2)
	2 B	25	4 (16.0)
	2 C	41	17 (41.5)
	alle	185	34 (18.4)
alle	1 Kontakt	252	122 (48.4)
	1 Selbst	293	190 (64.8)
	2 A	237	163 (68.8)
	2 B	253	183 (72.3)
	2 C	254	210 (82.6)
	alle	1289	868 (67.3)

Mit einem Chi-Quadrat von 399.47 bei 19 Freiheitsgraden ergibt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Zellen der Tabelle 14.

Betrachtet man alle Embryonalstadien gemeinsam, so unterscheiden sich die Versuchsreihen ebenfalls hoch signifikant voneinander. Innerhalb der Stadien unterscheiden sich die Morulae, die Jungen und die Expandierten Blastozysten voneinander. Ein Vergleich der Embryonen der Versuchsreihe 1/Kontaktseeding mit den Embryonen der "selbstseedenden Versuchsreihen" ergibt hoch signifikante Unterschiede, sowohl bei der Betrachtung aller Embryonen als auch oft bei den einzelnen Embryonalstadien. Die Chi-Quadratwerte und weitere statistische Angaben zu diesem Vergleich sind im Anhang dargestellt.

Es zeigt sich also ein deutlicher Einfluß der Seedingform auf die Überlebensrate der Embryonen, sowie die unterschiedliche Reaktion der verschiedenen Stadien der Präimplantations - embryonen auf die Kryokonservierung.

5.5 Die Ergebnisse in graphischer Darstellung

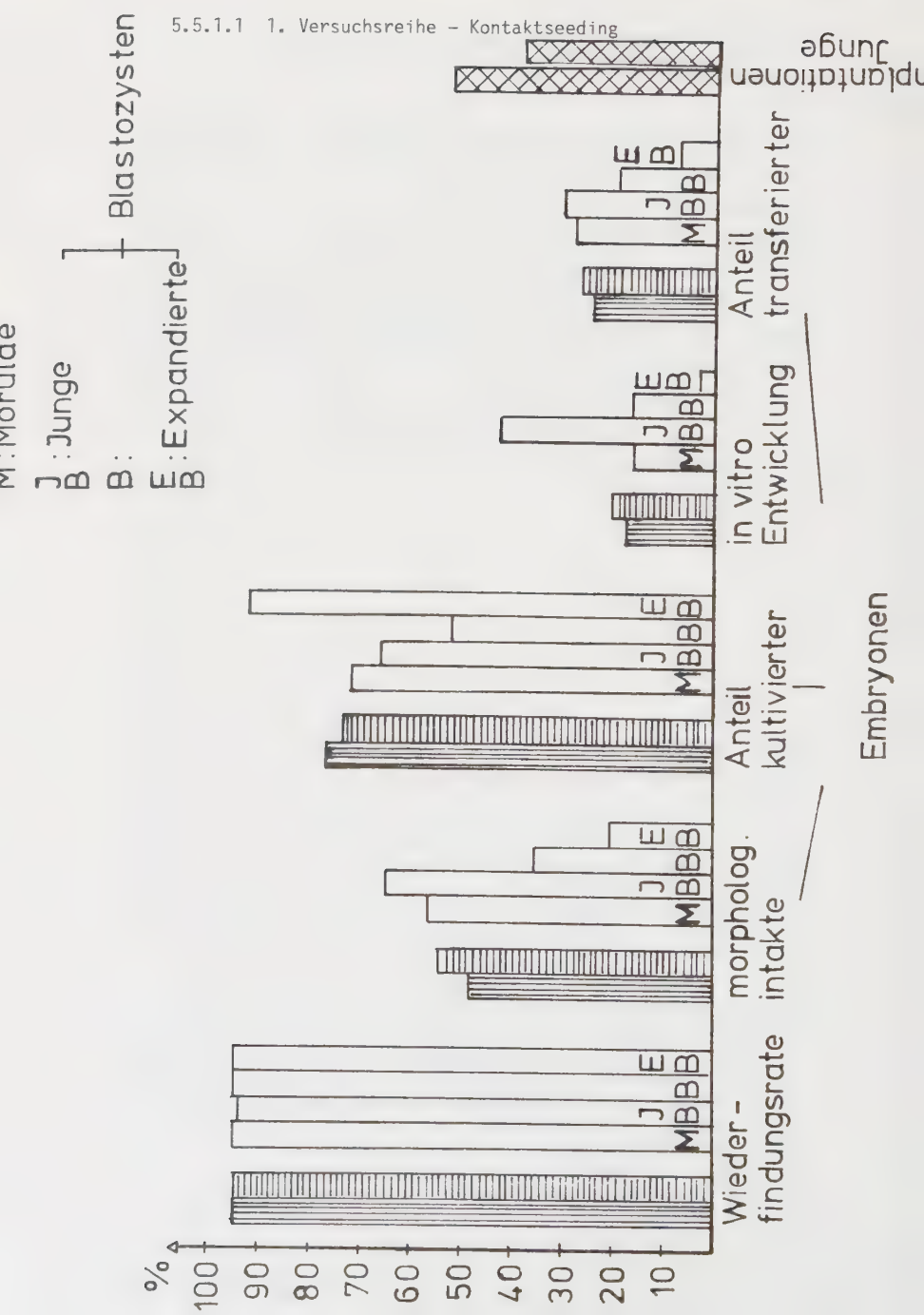
Nachdem in den letzten drei Kapiteln eine ausführliche tabellarische Darstellung der Ergebnisse erfolgte, soll nun eine schnelle Orientierung mit Balkendiagrammen ermöglicht werden. Auf eine vollständige Wiedergabe aller Daten aus den Tabellen wurde daher bewußt verzichtet. Die Prozentangaben beziehen sich, soweit nicht anders vermerkt, auf die in der Überschrift der entsprechenden Abbildung angegebenen Größe.

Um einen Vergleich mit anderen Autoren zu erleichtern, wurden neben den Ergebnissen der einzelnen Embryonalstadien und für alle Embryonen auch das Ergebnis ohne Expandierte Blastozysten, also von Morulae, Jungen Blastozysten und Blastozysten, dargestellt.

5.5.1 Die einzelnen Versuchsreihen

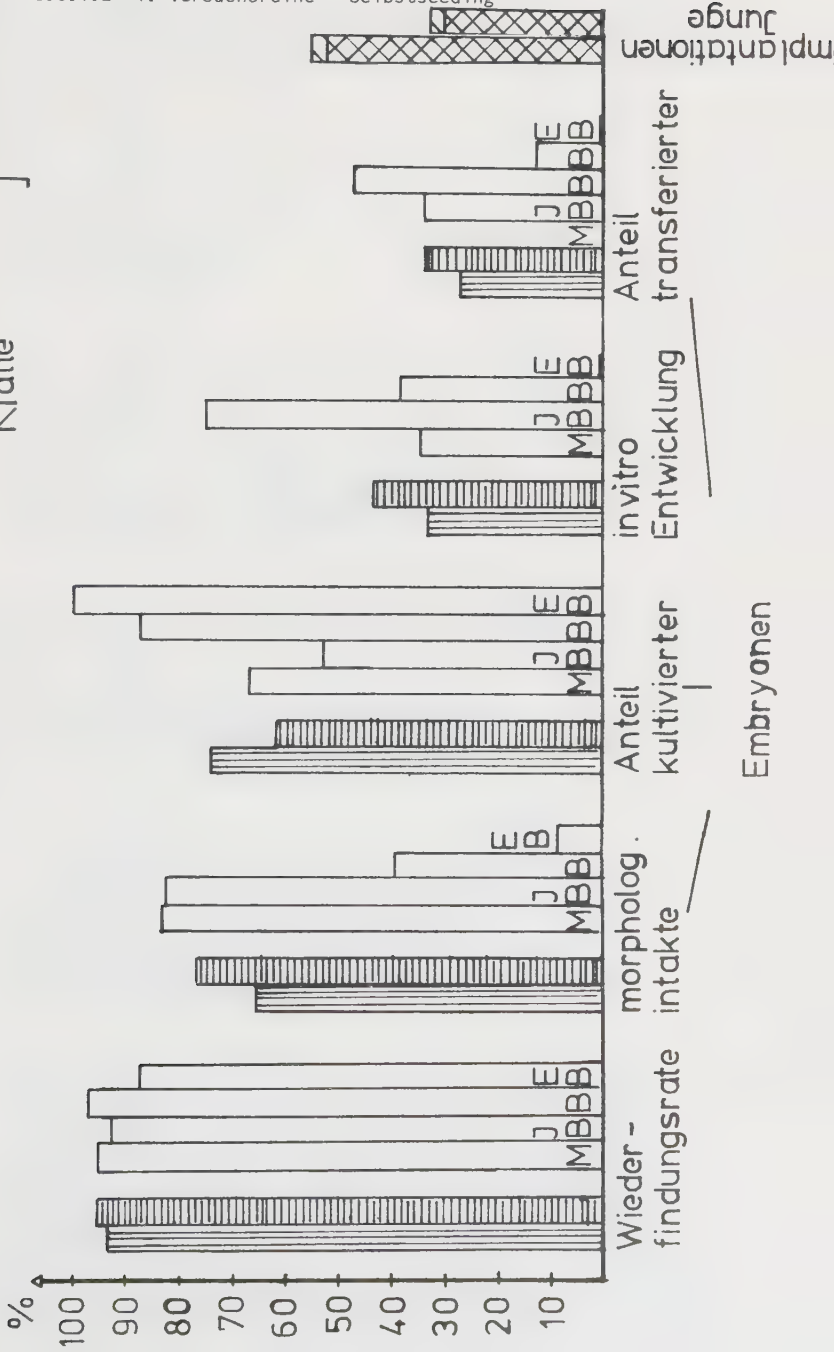
Die Prozentangaben in den Abbildungen dieses Abschnittes beziehen sich auf die Gruppe von Embryonen, an der das jeweilige Ergebnis erarbeitet wurde.

So ist die Wiederfindungsrate auf die Gesamtzahl der tiefgefrorenen Embryonen bezogen, der Anteil der morphologisch intakten, der kultivierten und der transferierten Embryonen bezieht sich dagegen auf die wiedergefundenen Embryonen. In gleicher Weise wird der Anteil der in vitro Entwicklung aus der Anzahl der kultivierten Embryonen berechnet, die Implantationsrate und die Zahl der lebend geborenen Jungen aus den transferierten Embryonen.



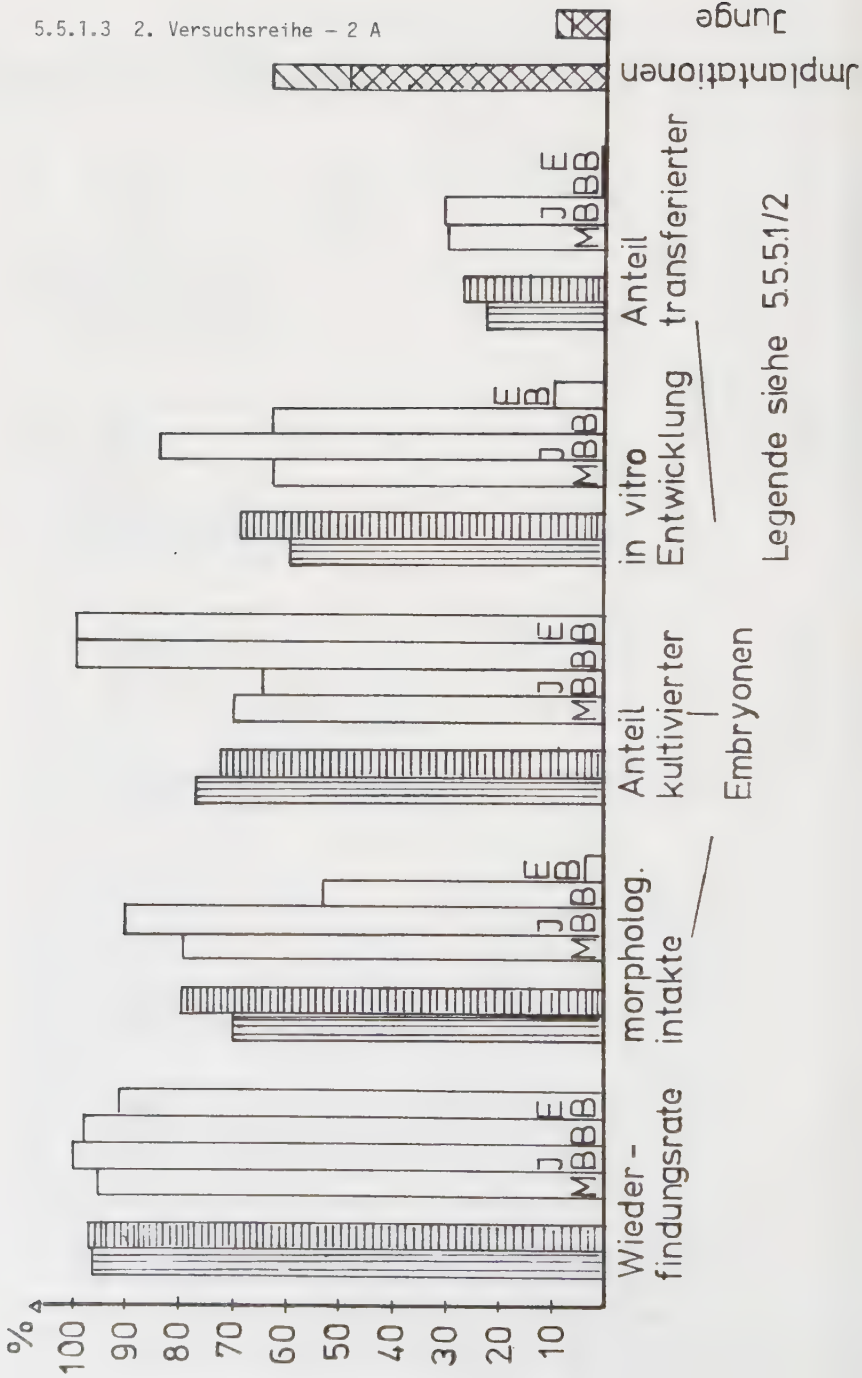
5.5.1.2 1. Versuchsreihe - Selbstseeding

■ Embryonen ohne Exp. Blastozysten
 ▨ nur trchtige
 □ alle
 Empfänger

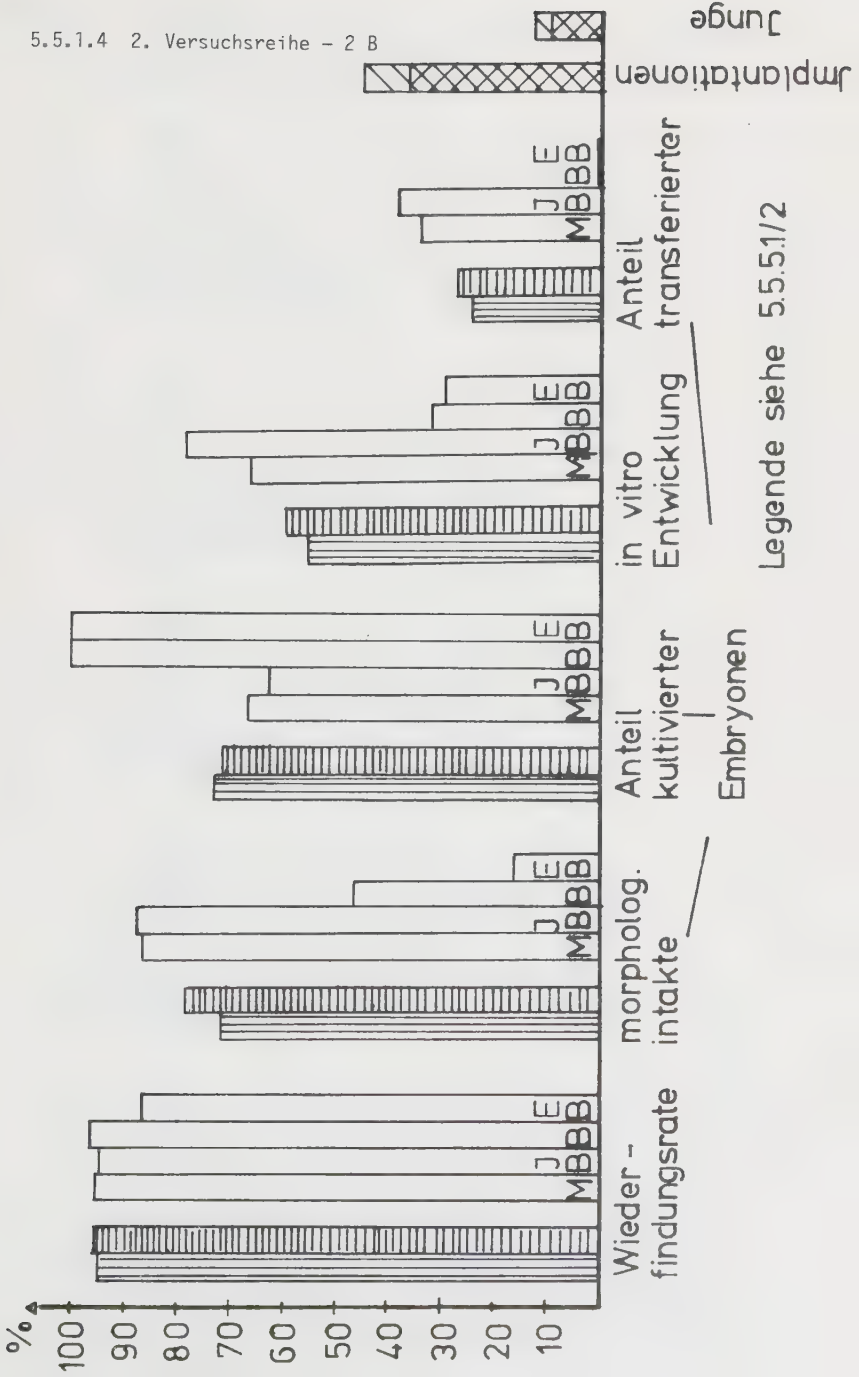


Embryonen

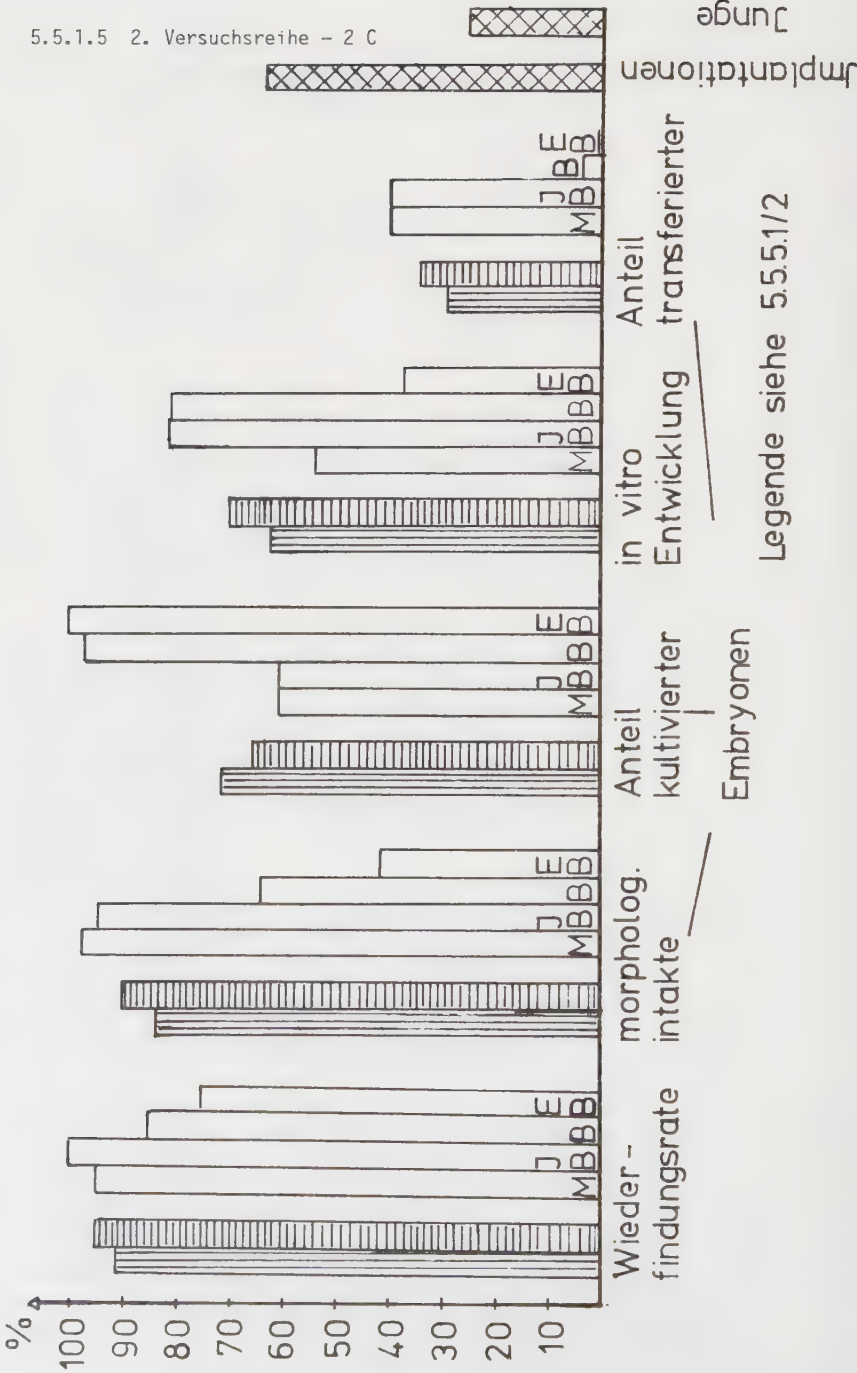
5.5.1.3 2. Versuchsreihe – 2 A



5.5.1.4 2. Versuchsreihe - 2 B



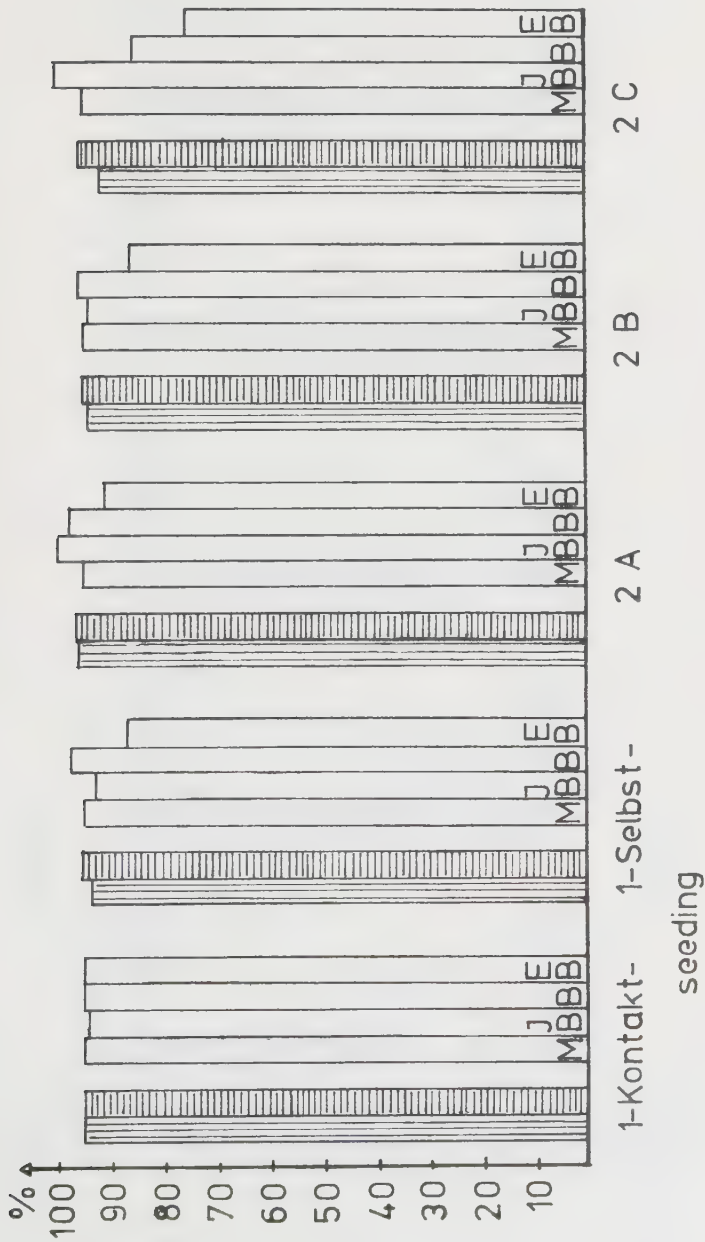
5.5.1.5 2. Versuchsreihe - 2 C



Legende siehe 5.5.1/2

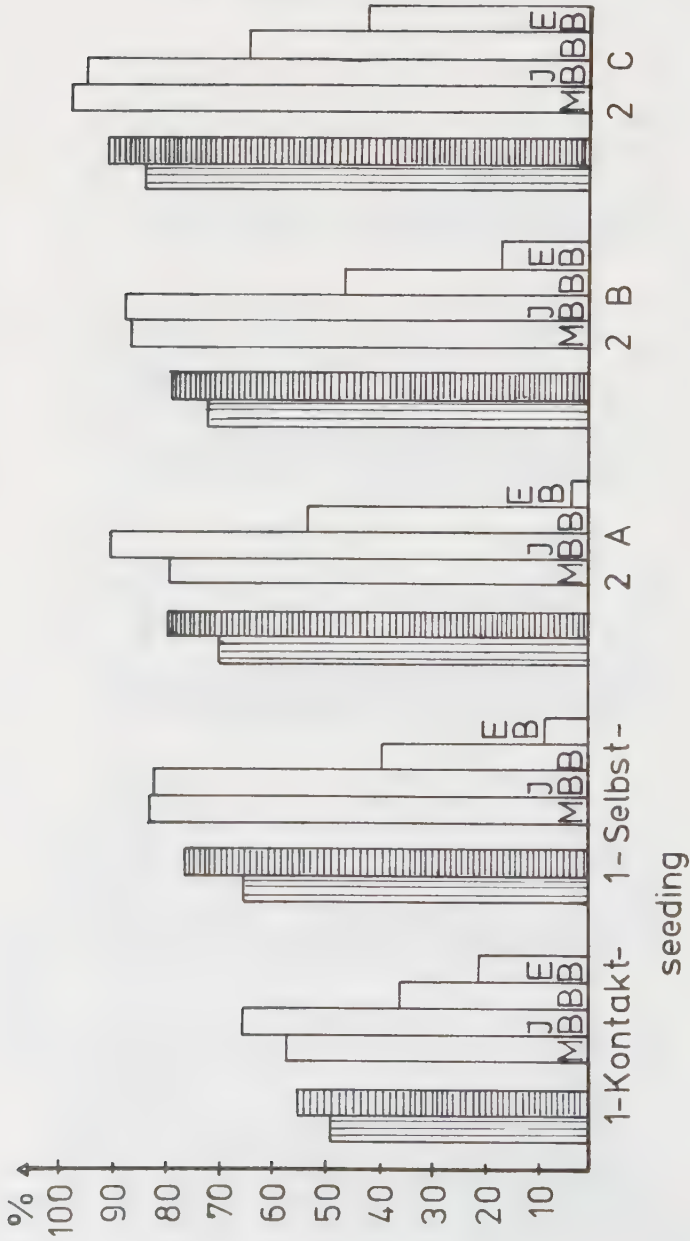
5.5.2 Gegenüberstellung beider Versuchsreihen

5.5.2.1 Die Wiederfindungsrate



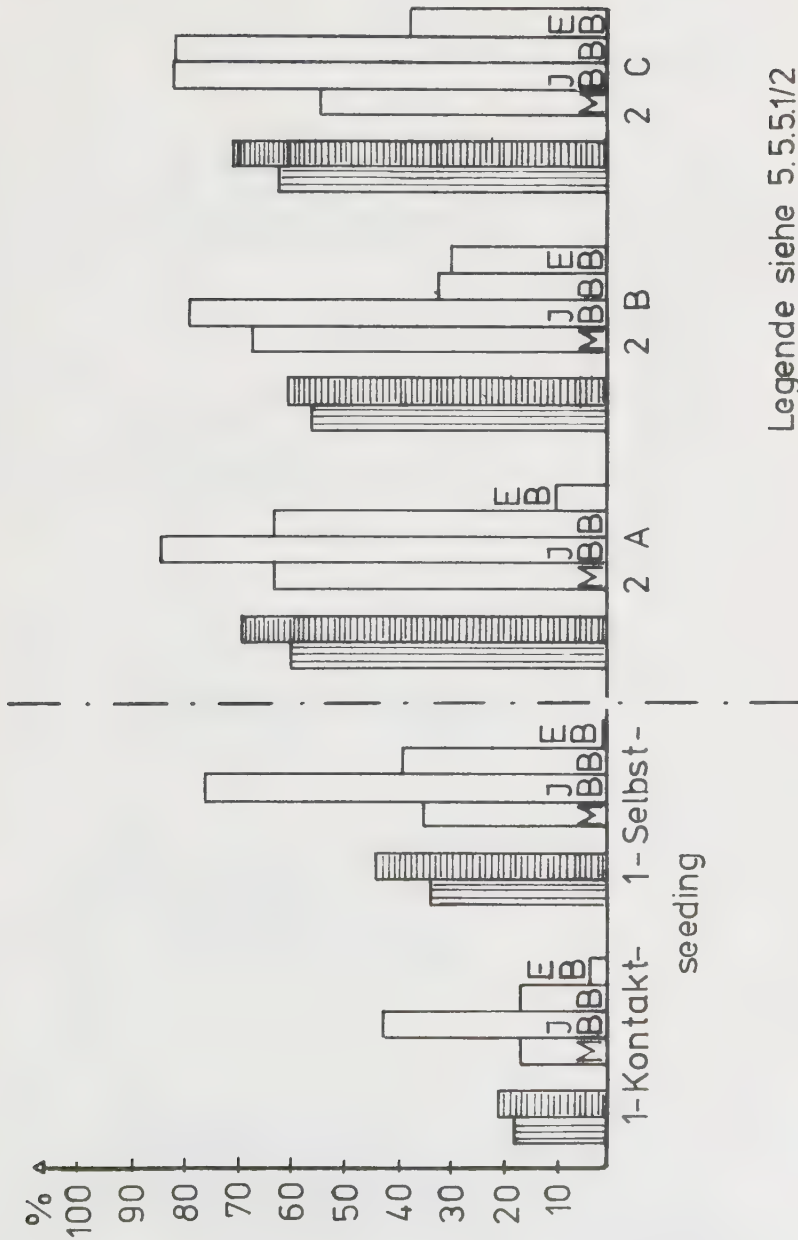
Legende siehe 5.5.1/2

5.5.2.2 Der Anteil morphologisch intakter Embryonen



Legende siehe 5.5.1/2

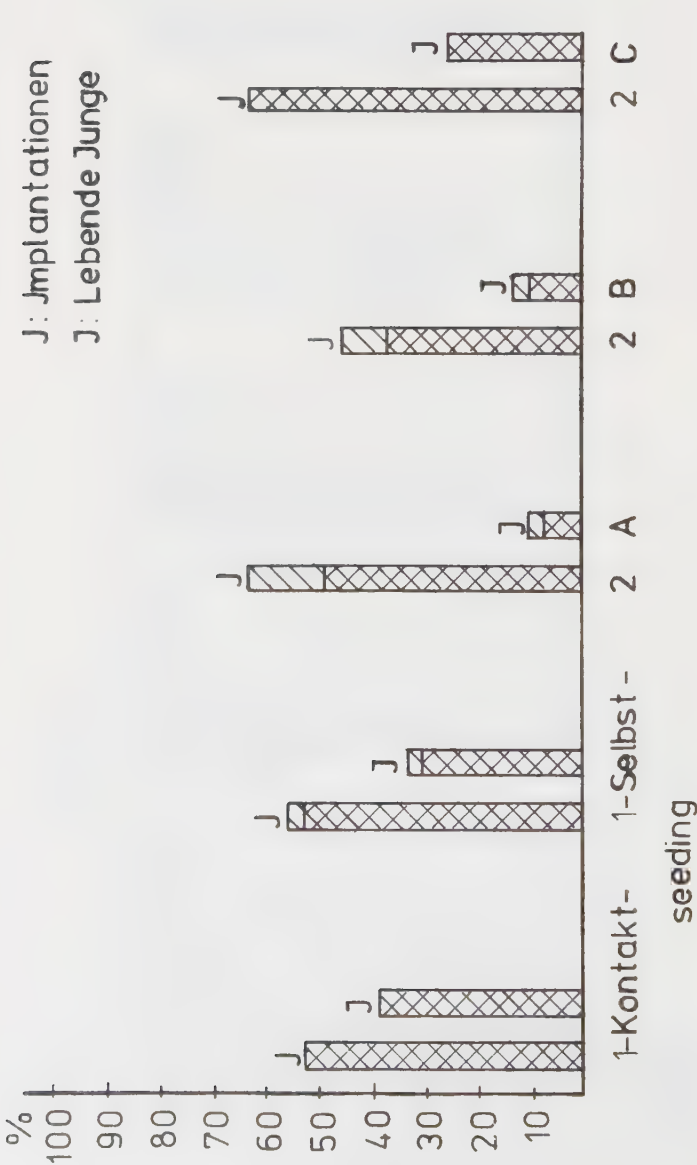
5.5.2.3 Die in vitro Entwicklung



Legende siehe 5.5.1/2

5.5.2.4 Die Transferergebnisse

Eine Differenzierung nach Embryonalstadien ist aus versuchs-
technischen Gründen nicht möglich.



6 Diskussion

In den Vereinigten Staaten wird die Kryokonservierung lebender Gewebe zum Teil mit Dewar-Gefäßen betrieben, und ein so bedeutender Forscher wie LEIBO steht dem Einsatz komplizierter Geräte zu diesem Zweck kritisch gegenüber (108). In der Tat werfen LEIBOs gute Ergebnisse bei der Kryokonservierung von Säugerembryonen die Frage auf, ob sich der Einsatz derart teurer Maschinen wie der CTE 8000 überhaupt lohnt, zumal auch mit dem "handbetriebenen" Offenen System akzeptable Überlebensraten erreichbar sind, wie POKORNY und HÜNLICH zeigen konnten (77,167).

Um diese Frage beantworten zu können, ist es notwendig, zunächst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenzufassen. So erwies sich das neu entwickelte Selbstseeding-System als zuverlässig wirksam. Die Mess- und Regelgenauigkeit der Gefrieranlage liegt jenseits des Bereiches, der den üblichen Gefriergeräten meßtechnisch zugänglich ist. Damit ergibt sich nun die Möglichkeit, wirklich identische Versuchsreihen unabhängig voneinander, z. B. zu verschiedenen Jahreszeiten, durchzuführen, also im naturwissenschaftlichen Sinne reproduzierbar einzufrieren. Diesen Vorteilen stehen keine nachteiligen Auswirkungen auf die Qualität der tiefgekühlten Mäuseembryonen entgegen.

Schon in der ersten Versuchsreihe überlebten 64 % der Embryonen nach einem Selbstseeding den Tiefgefriervorgang. Dieser Prozentsatz ließ sich bei der zweiten Versuchsreihe auf 83% bei sehr langer Kristallisationsdauer steigern.

Diese Zahlen mit den Ergebnissen anderer Autoren zu vergleichen, erweist sich als außerordentlich schwierig. Zum einen sind bisher Expandierte Blastozysten kaum eingefroren worden. Da sie die Kryokonservierung nur sehr schlecht überstehen, müssen sie also bei einer Gegenüberstellung bei den eigenen Ergebnissen unberücksichtigt bleiben.

Des weiteren muß die Vergleichbarkeit der betrachteten Arbeiten gewährleistet sein. So ist die Gruppengröße und die Art der Bestimmung der Überlebensrate in der Literatur sehr unterschiedlich. Im amerikanischen Schrifttum ist es zum Beispiel üblich, nicht Absolutzahlen zu nennen, sondern nur den Prozentsatz der Embryonen, der sich im Vergleich zu einer nicht eingefrorenen Kontrollgruppe weiterentwickelt hat. Da auch ganz verschiedene genetische Stämme der Maus verwendet werden, bleiben bei einer kritischen Abwägung nur einige wenige Arbeiten, mit denen die hier vorgestellten Ergebnisse vergleichbar sind.

In der folgenden Tabelle soll dennoch eine Gegenüberstellung versucht werden. Dazu werden die Arbeiten, die sich in den letzten Jahren mit der Kryokonservierung von Mäuseembryonen beschäftigt haben, mit der jeweils besten Versuchsreihe vorgestellt.

Tab. 16: Gegenüberstellung deutschsprachiger Arbeiten über die Kryokonservierung von Präimplantationsembryonen der Maus - näheres siehe Text

Autor	Embryonen wiedergefunden		Überlebensrate		Embryonen transferriert		Implantationen		Junge	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HEISE (1974)	640	100	372	58.1	124	100	54	44.0	33	27.0
GÖRDING (1966)	180	100	141	78.0	30	100	?	?	18	62.9
AL HASANI et al. (2)	282	100	201	71.0	62	100	27	44.0	10	16.1
HÜNLICH (1977)	91	100	66	72.5	35	100	?	?	22	62.5
eigene Arbeit (alle Stadien)	254	100	210	82.6	73	100	46	63.0	18	24.7
eigene Arbeit (ohne Expansion- dierte Blastozysten)	213	100	193	90.6	73	100	46	63.0	18	24.7

Die im Vergleich zu den anderen Autoren schlechtere Qualität der "kontaktgeseedeten" Embryonen bei der morphologischen Beurteilung nach dem Auftauen ist wohl auf die Anwendung strengerer Kriterien zurückzuführen. Dafür spricht jedenfalls die durchaus vergleichbare Implantationsrate von ca. 54%.

Woran liegt es nun, daß die Embryonen ein Selbstseeding besser überstehen als das übliche Kontaktseeding? Betrachtet man die verschiedenen Kristallisationszeiten, so gewinnt man den Eindruck, daß die Ergebnisse umso besser werden, je länger der Vorgang dauert. Dies betrifft vor allem die älteren Präimplantationsembryonen, wobei erst bei Kristallisationszeiten um die 20 Minuten akzeptable Überlebensraten bei den Expandierten Blastozysten erreicht werden können. Langsames Seeding wird zwar durch die Versuchsanordnung erreicht (siehe 5.3), hat aber niedrige Kühlraten zur Voraussetzung.

Auf den ersten Blick scheint dies im Widerspruch zu MAZURs Erkenntnis zu stehen, daß sehr niedrige Kühlraten die Überlebensrate der Mäuseembryonen drastisch reduzieren (128,129). Die bei ihm und auch bei LEIBO und WHITTINGHAM (104,213,215) angegebenen Kühlraten sind jedoch für den Bereich von -10 bis -70 °C errechnet worden und gelten nach dem Seeding. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde diese niedrige Kühlrate von -0.1 K/min nur vor, während und kurz nach dem Seeding, also für relativ kurze Zeit, benutzt. Das Verweilen bei höherer Temperatur wirkt sich auch deswegen nicht negativ aus, weil die Konzentration der Stoffe in der Gefrierschutzlösung nicht enorm hoch ist, wie nach einem Kontaktseeding (siehe 4.1.2), sondern erst langsam und je länger die Kristallisation dauert, umso langsamer, ansteigt.

Dies erklärt auch, warum gerade ältere Präimplantationsembryonen beim Tiefgefriervorgang längere Kristallisationszeiten besser vertragen, da mit zunehmender Ausreifung des Blastozoels die Diffusionsvorgänge, die durch die unterschiedliche Konzentration osmotisch wirksamer Substanzen im Medium und im Intra- bzw. Extrazellularraum des Embryos in Gang kommen, mehr Zeit

erfordern. Die langsame Kristallisation vermeidet darüberhinaus größere Konzentrationsunterschiede zwischen Embryo und Medium, was einer mechanischen Überbeanspruchung von Membransystemen entgegenwirkt. Nicht vergessen werden darf natürlich, daß bei unsachgemäßem Kontaktseeding ein Teil der Embryonen durch die Eisbildung unter den Branchen der Pinzette mechanisch zerstört wird. Dies entfällt natürlich bei einem Selbstseedingvorgang. Die intrazelluläre Kristallisation, die ja in der Literatur als eine der Hauptursachen für das Absterben der Zellen beim Tiefgefrieren angesehen wird, dürfte durch das Selbstseeding sicher vermieden werden, da die Zellen ideal Gelegenheit haben zu dehydrieren und somit eine Eisbildung verhindert wird.

Auch wenn die Versuchsanordnung so gewählt wird, daß das Seeding im Reglerstraw erst beginnt, wenn die Kristallisation in den Embryoncontainern schon längere Zeit im Gange ist, schadet die sich auf dem Schreiber ergebende schnelle Abkühlung und Wiedererwärmung durch die Reglerbewegung den Embryonen nicht. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu LEIBOs Beobachtung (108), daß die hohen Abkühlgeschwindigkeiten nach einem Supercooling einen Großteil der Embryonen zerstören. Beim Selbstseeding liegen jedoch andere Verhältnisse vor. Bei der Temperatur, bei der die Stellbewegung durch die Kristallisation im Reglerstraw ausgelöst wird, liegt in den Embryocontainern ein Teil des Mediums noch flüssig vor. Die rasche Abkühlung, die durch die Reglerbewegung zum Ausgleich der Kristallisationswärme im messenden Straw verursacht wird, erhöht die freie Entropie ΔS der Lösung und es kristallisiert mehr Medium in den Embryostraws aus. Dabei wird ebenfalls Wärme frei. Die tatsächlich erfolgte Abkühlung wirkt sich relativ, also für die Embryonen, nicht aus.

Welche Schlußfolgerungen sind nun aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu ziehen ?

Zunächst kann gesagt werden, daß die von MIYAMOTO (156) geäußerte Meinung, die Überlebensrate tiefgefrorener Embryonen werde nur wenig von der Kristallisationstemperatur beeinflusst, bestätigt werden konnte.

Jedoch erwies sich die Art des Seedings als bedeutsam für die Überlebensrate. Je schonender die Kristallisation abläuft, desto besser überstehen insbesondere ältere Präimplantations-embryonen die Kryokonservierung.

Daneben zeigte sich, daß auch das Embryonalstadium ganz entscheidend die Überlebensrate beeinflusst. Besonders geeignet für die Kryokonservierung erwiesen sich von den untersuchten Stadien die Jungen Blastozysten. Damit konnte gezeigt werden, daß derartige Unterschiede nicht nur auf befruchtete und unbefruchtete Eizellen der Maus beschränkt sind (79), sondern auch zwischen Morulae und verschiedenen alten Blastozysten bestehen.

Nun ist eine Rückkehr zu der anfangs gestellten Frage nach der Berechtigung der verwendeten Einfriermethode möglich. Zunächst kann festgestellt werden, daß die durchgeführten Untersuchungen über die Auswirkungen der Kristallisation nur mit der vorgestellten Selbstseedingmethode möglich waren. Diese setzt aber ein "Offenes System" und eine präzise arbeitende Regelung voraus. Keine der bisher bekannten Gefriermaschinen erfüllte diese Voraussetzungen. In Kühlbädern oder Kammergefriergeräten ist ein schonendes Selbstseeding nicht möglich, da sich in der Umgebung der Embryobehälter kein Temperaturgradient bildet, der für diesen Zweck nutzbar wäre.

Die bisher verwendeten "Offenen Systeme" (siehe 2.2.6.4 und 2.2.6.5) arbeiten entweder mit einer recht ungenauen automatischen Regelung, oder der Experimentator muß sogar die Absenkgeschwindigkeit der Straws "mit der Hand", d.h. mit einem Potentiometer nach seiner Erfahrung regeln, wobei er nur die schon erfolgte Abweichung vom vorgegebenen Temperaturprofil als "Steueranweisung" benutzen kann. Damit wird eine rechtzeitige und angemessene Reaktion auf die anlaufende Kristallisation in den Straws unmöglich.

Wie beim Kontaktseeding kommt es zu einer unkontrollierten Erwärmung durch die freiwerdende Kristallisationsenergie.

Die Regelung der CTE 8000 vermag jedoch den Temperaturanstieg in den Embryocontainern, der durch die Kristallisationswärme verursacht wird, nahezu vollständig zu verhindern. Neben diesen wissenschaftlichen Aspekten gibt es auch ökonomische Gründe für die Entwicklung und den Einsatz von Geräten wie der CTE 8000 für die Tieftemperaturkonservierung von Säugerembryonen.

Zum einen ist die ständige Anwesenheit des Experimentators während eines Gefriervorganges nicht mehr nötig, da die Maschine absolut zuverlässig arbeitet. Da zum anderen das verwendete Gefrierverfahren einen höheren Prozentsatz intakter Embryonen ergibt, als bisherige Systeme, wobei die Überlebensrate sicher noch verbessert werden kann, ist mit einer solchen Maschine auch wertvolles lebendes Gewebe kryokonservierbar. Hier sei nur die Kryokonservierung von Embryonen von "Hochleistungskühen" genannt, bei denen schon einige erfolgreiche Transfers genügen, um die Kosten der Maschine zu amortisieren. Mit der Möglichkeit, den Ablauf der Kristallisation zu beobachten und, jedenfalls in Grenzen, zu beeinflussen, haben sich viele neue Fragen ergeben.

So bleibt noch zu klären, bis zu welcher Temperatur Anteile des Mediums flüssig vorliegen und ob dies auch der Fall ist, wenn die Kristallisation im Straw optisch schon abgeschlossen erscheint.

Auch sollte untersucht werden, wie sich höhere Kühl- und Auftaugeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der im Medium vorliegenden Phase auf die Überlebensrate der Embryonen auswirken. Des weiteren wäre es interessant zu sehen, ob durch verschiedene Arten der Reglerreaktion auf die Kristallisation in den Straws die Embryoqualität beeinflusst wird.

Als wichtigstes praktisches Problem ist die Herstellung der "Erlanger Straws" noch so zu standardisieren, daß jeder Einfluß auf das Kristallisationsgeschehen ausgeschlossen werden kann.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit sollte die Frage klären, ob und in welchem Umfang verschieden ablaufende Kristallisationsvorgänge bei der Kryokonservierung die Überlebensrate von Präimplantationsembryonen der Maus beeinflussen und wie diese Vorgänge ablaufen. Dazu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Das Selbstseeding

Ein neu entwickeltes Selbstseedingverfahren, das sich als zuverlässig erwies, erlaubt es, auf das übliche Kontaktseeding zu verzichten. Die Dauer der Kristallisationsvorgänge in den "Erlanger Straws" ist durch die Versuchsanordnung gut steuerbar. Die verwendete Gefrieranlage (CTE 8000), die ebenfalls eine Neukonstruktion darstellt, arbeitet fehlerfrei.

2. Der Ablauf der Kristallisation

Wenn im Straw eine Temperatur von etwa -4.2°C erreicht ist, kann der Mediumkristall aus der Geißel in das Innere des Röhrchens "vorwachsen". Dabei bilden sich bei länger dauernden "Seedingabläufen" Kristallnadeln, die spiralig durch das Medium wachsen und zunächst flüssige Bezirke freilassen.

3. Erste Versuchsreihe

Insgesamt 266 Morulae und Blastozysten wurden einem Kontaktseeding, 313 Embryonen einem Selbstseeding unterworfen. Signifikant mehr (64.8% gegenüber 48.4%) Embryonen überlebten das Selbstseeding und entwickelten sich in der Kultur weiter (32.6% bzw. 16.7%). Die Implantationsrate unterschied sich nicht signifikant.

4. Zweite Versuchsreihe

Es wurden drei Kristallisationszeiten untersucht, nämlich etwa 14 Sekunden, 4 Minuten und 20 Minuten. Nach der Kryokonservierung wurden 237, 253 und 254 Embryonen wiedergefunden, von denen sich 68.8, 72.3 bzw. 82.7 Prozent morphologisch nicht verändert hatten. In der Kultur entwickelten sich 59.7, 55.1 und 62.4 Prozent weiter. 62.8, 44.9 und 63.0 Prozent der transferierten Embryonen implantierten.

5. Unterschiede zwischen den Embryoalstadien

Eine Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf die untersuchten Stadien - Morula, Junge Blastozyste, Blastozyste und Expandierte Blastozyste - ergab, daß diese die Kryokonservierung verschieden gut überstehen. Am besten scheinen Junge Blastozysten für die Tieftemperaturkonservierung geeignet zu sein. Bei den Expandierten Blastozysten konnte nur bei sehr langer Kristallisationsdauer eine akzeptable Überlebensrate erreicht werden.

6. Schlußfolgerungen

Die Kombination aus einem microcomputergesteuerten "Offenen System" und der neuen Selbstseedingmethode erwies sich als zuverlässig und einfach in der Bedienung. Diese Vorteile sind mit vergleichsweise sehr guten Ergebnissen bei der Kryokonservierung von Mäuseembryonen gepaart. Daneben erlaubt es das System, reproduzierbare Tiefgefriervorgänge durchzuführen und eröffnet völlig neue Möglichkeiten für die Forschung auf dem Gebiet der Kryokonservierung .

8 Anhang

In diesem Kapitel sind diejenigen Daten enthalten, auf deren Darstellung in den vorhergehenden Abschnitten verzichtet werden mußte, um den Text lesbar zu erhalten. Daneben werden alle Ergebnisse der verwendeten statistischen Verfahren beschrieben. Die Auswertung der Beobachtungen und Meßwerte dieser Arbeit erfolgte teilweise mittels des Programmpaketes SPSS, Version H, Release 8.1, auf dem Siemensrechner BS 2000 im Institut für biomedizinische Statistik und Dokumentation (Vorstand: Prof. Dr. L. Horbach). Die Auswertung der Versuchsreihen zur Kryokonservierung von Mäuseembryonen erfolgte mit einem eigenen Programm auf einem Microcomputer (TRS-80 M1). Der größeren Übersichtlichkeit wegen sind die folgenden Abschnitte nicht fortlaufend nummeriert, sondern die Ziffern nach der Kapitelnummer 8 entsprechen denen des Abschnittes, in dem die besprochenen Ergebnisse behandelt werden.

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

1 K	:= 1. Versuchsreihe - Kontaktseeding
1 S	:= 1. Versuchsreihe - Selbstseeding
2 A	:= 2. Versuchsreihe - sehr kurze Kristallisation
2 B	:= 2. Versuchsreihe - mittlere Kristallisation
2 C	:= 2. Versuchsreihe - lange Kristallisation
FG	:= Freiheitsgrade
m	:= arithm. Mittelwert
MAQ	:= Mittleres Abweichungsquadrat
n	:= Fallzahl
p	:= Wahrscheinlichkeit, die Hypothese zu verwerfen, obwohl sie zutrifft
s	:= Standardabweichung
SAQ	:= Summe der Abweichungsquadrate
X	:= Chi-Quadrat

8.4.3 Verfahren zur Untersuchung der Kristallisation

Die während des Versuches protokollierten Daten wurden auf einen Erhebungsbogen übertragen und mit verschiedenen SPSS-Prozeduren dann Häufigkeitsverteilungen untersucht und einfache Varianzanalysen unternommen. Einzelheiten zu den verwendeten Prozeduren und zu den entsprechenden Algorithmen müssen der Literatur zu diesem Programm entnommen werden (21).

In den folgenden Tabellen sind die Dimensionen weggelassen worden. Für den Kristallisationsbeginn gilt als Benennung <grd. Celsius>, für die Kristallisationsdauer <Minuten> als vereinbart.

8.4.3.1 Der Einfluß der verschiedenen Typen von "Erlanger Straws" auf die Kristallisation

** Häufigkeit

Typ	absolut	relativ	kumulativ
A	76	0.517	0.517
B	30	0.204	0.721
C	5	0.034	0.755
D	36	0.245	1.000
alle	147	1.000	1.000

** Gefriergut/Meßfühler

Typ	Versuchsreihe			Meßfühler enthalten	Embryonen enthalten	leer
	1	K	2			
A	19	38	19	28	28	20
B	2	0	28	26	4	0
C	0	0	5	2	3	0
D	2	0	34	0	36	0
alle	23	38	86	56	71	20

K := Versuche zur Beobachtung der Kristallisation

** Beeinflussung des Kristallisationsbeginnes

Typ	m	s	n
A	4.3	1.25	72
B	4.8	1.53	30
C	4.6	0.26	5
D	4.2	1.00	36
alle	4.4	1.24	143

Fehlende Fälle : 4

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	9.006	3	3.002	1.941	0.1258
innerhalb der Gruppen	214.982	139	1.547	-	-
gesamt	223.986	142	-	-	-

** Beeinflussung der Kristallisationsdauer

Typ	m	s	n
A	7.50	6.71	61
B	5.98	7.18	29
C	2.03	1.53	5
D	10.54	9.22	36
alle	7.79	7.49	131

Fehlende Fälle : 16

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	538.354	3	179.451	3.195	0.0258
innerhalb der Gruppen	7132.100	127	56.158	-	-
gesamt	7670.454	130	-	-	-

8.4.3.2 Einfluß der Anwesenheit von Embryonen im Straw

** Beeinflussung des Kristallisationsbeginnes

Fehlende Fälle : 4

Embryonen	m	s	n
nein	4.5	1.31	74
ja	4.3	1.12	69
alle	4.4	1.25	143

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	1.96	1	1.96	1.247	0.2660
innerhalb der Gruppen	222.02	141	1.57	-	-
gesamt	223.98	142	-	-	-

Konfidenzintervall des Mittelwertes

Embryonen	m	95% Konfidenzintervall
nein	4.5	4.2 bis 4.8
ja	4.3	4.0 bis 4.5
gesamt	4.4	4.2 bis 4.6

** Beeinflussung der Kristallisationsdauer

Fehlende Fälle : 16

Embryonen	m	s	n
nein	5.57	5.99	60
ja	9.58	8.49	71
alle	7.79	7.46	131

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	499.31	1	499.31	8.982	0.0033
innerhalb der Gruppen	7171.10	129	55.59	-	-
gesamt	7670.41	130	-	-	-

Konfidenzintervall des Mittelwertes

Embryonen	m	95% Konfidenzintervall			
nein	5.67	4.12	bis	7.22	
ja	9.58	7.57	bis	11.59	
gesamt	7.79	6.46	bis	9.12	

Da die Kristallisationsdauer einer der Parameter der zweiten Versuchsreihe darstellte, muß angenommen werden, daß der oben errechnete Gruppenunterschied auf einem Versuchseffekt beruht. Um dies nachzuweisen wurden die einzelnen Zeiträume nochmals getrennt untersucht.

1. Kristallisationsdauer bis 5 Minuten

Embryonen	m	min	max	n	95% Konfidenzintervall	
nein	1.53	0.10	5.00	36	0.96	bis 2.09
ja	1.98	0.10	5.00	33	1.57	bis 2.97
alle	1.88	0.10	5.00	69	1.44	bis 2.33

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	9.40	1	9.40	2.823	0.098
innerhalb der Gruppen	233.10	67	3.33	-	-
gesamt	242.50	68	-	-	-

2. Kristallisationsdauer von 5.01 bis 10 Minuten

Embryonen	m	min	max	n	95% Konfidenzintervall	
nein	7.28	5.60	10.00	10	6.19	bis 8.37
ja	8.36	6.00	10.00	11	7.23	bis 9.50
alle	7.85	5.60	10.00	21	7.09	bis 8.61

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	6.15	1	6.15	2.362	0.1408
innerhalb der Gruppen	49.48	19	2.60	-	-
gesamt	55.63	20	-	-	-

3. Kristallisationsdauer von 10.01 bis 20 Minuten

Embryonen	m	min	max	n	95% Konfidenzintervall
nein	15.12	10.90	20.00	14	13.47 bis 16.77
ja	16.67	11.00	20.00	19	14.89 bis 18.46
alle	16.02	10.90	20.00	33	14.81 bis 17.22

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	19.42	1	19.42	1.71	0.2007
innerhalb der Gruppen	352.20	31	11.36	-	-
gesamt	371.05	32	-	-	-

4. Kristallisationsdauer über 20 Minuten

Alle Straws, in denen die Kristallisation länger als 20 Minuten dauerte, waren Embryocontainer.

Betrachtet man nur Straws, die den selben Versuchsreihen entstammen, so läßt sich kein Einfluß der Embryonen auf die Kristallisationsdauer mehr feststellen. Eine Kovarianzanalyse ergab einen deutlichen Einfluß der Variablen "Versuchsreihe" auf die Kristallisationsdauer ($F=12.75$ $p=0.001$), was zu diesem Bild paßt.

8.4.3.3 Der Einfluß des Meßfühlers

** Beeinflussung des Kristallisationsbeginnes

Fehlende Fälle : 4

Meßfühler	m	s	n
nein	4.2	1.05	89
ja	4.8	1.48	54
alle	4.4	1.26	143

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	11.77	1	11.77	7.819	0.0059
innerhalb der Gruppen	212.22	141	1.50	-	-
gesamt	223.99	142	-	-	-

Konfidenzintervall des Mittelwertes

Meßfühler	m	95% Konfidenzintervall			
nein	4.2	3.9	bis	4.4	
ja	4.8	4.4	bis	5.2	
gesamt	4.4	4.2	bis	4.6	

** Beeinflussung der Kristallisationsdauer

Fehlende Fälle : 16

Meßfühler	m	s	n
nein	9.31	8.34	77
ja	5.62	6.06	54
alle	7.79	7.49	131

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	430.80	1	430.80	7.676	0.0064
innerhalb der Gruppen	7239.59	129	56.12	-	-
gesamt	7670.39	130	-	-	-

Konfidenzintervall des Mittelwertes
Meßfühler m 95% Konfidenzintervall

nein	9.31	7.41	bis	11.20
ja	5.62	3.97	bis	7.28
gesamt	7.79	6.46	bis	9.08

8.4.4 Eingriff in die Regelung

Art der Manipulation	n	im folgenden abgekürzt
keine	77	Ø
Springen	47	Spr
Halt/Springen	19	H/S
Halt ohne Regelung	4	HoR

H/S und HoR bewirken gleichzeitig eine Ist-Sollwert-Übernahme

** Beeinflussung des Kristallisationsbeginnes

Fehlende Fälle : 4

Manipulation	m	s	n
Ø	4.5	1.37	73
Spr	4.3	1.09	47
H/S	4.0	0.99	19
HoR	5.5	1.65	4
gesamt	4.4	1.25	143

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	8.50	3	2.83	1.827	0.1450
innerhalb der Gruppen	215.49	139	1.55	-	-
gesamt	223.99	142	-	-	-

Konfidenzintervall des Mittelwertes

Manipulation	m	95% Konfidenzintervall
Ø	4.5	4.1 bis 4.8
Spr	4.3	4.0 bis 4.7
H/S	4.0	3.5 bis 4.5
HoR	5.5	2.9 bis 8.2
gesamt	4.4	4.2 bis 4.6

Im SCHEFFE-Test (21) unterscheiden sich keine zwei der Gruppen auf dem 0.05 Niveau.

**** Beeinflussung der Kristallisationsdauer**

Fehlende Fälle :16

Manipulation	m	s	n
Ø	4.32	5.01	68
Spr	11.78	8.94	41
H/S	11.76	7.28	19
HoR	6.72	5.69	3
gesamt	7.79	6.81	131

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen den Gruppen	1772.78	3	590.93	12.725	<0.001
innerhalb der Gruppen	5897.66	127	46.44	-	-
gesamt	7670.44	130	-	-	-

Konfidenzintervall des Mittelwertes

Manipulation	m	95% Konfidenzintervall		
Ø	4.32	3.11	bis	5.54
Spr	11.78	8.96	bis	14.60
H/S	11.76	8.25	bis	15.26
HoR	6.72	0.00	bis	20.84
gesamt	7.79	6.46	bis	9.12

Im SCHEFFE-Test (21) unterscheiden sich nur die Gruppen "Springen" und "Halt/Springen" auf dem 0.05 Niveau von der Gruppe "keine Manipulation".

8.4.5 Die Wirkung verschiedener Kühlraten

Kühlrate	n	im folgenden benutzte Abkürzung
0.10 K/min	43	1
0.20 K/min	4	2
0.30 K/min	91	3
1.00 K/min	5	10

**** Beeinflussung des Kristallisationsbeginnes**

Fehlende Fälle :4

Kühlrate	m	s	n
1	4.6	1.11	43
2	4.9	0.17	4
3	4.3	1.35	91
10	3.5	0.49	5
gesamt	4.4	1.25	143

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen	7.73	3	1.59	1.591	0.1944
den Gruppen					
innerhalb	216.53	139	1.58	-	-
der Gruppen					
gesamt	224.26	142	-	-	-

**** Beeinflussung der Kristallisationsdauer**

Fehlende Fälle :16

Kühlrate	m	s	n
1	10.77	9.31	42
2	4.91	0.99	2
3	6.19	6.52	82
10	10.18	3.15	5
gesamt	7.79	7.44	131

Varianztabelle

Einflußgröße	SAQ	FG	MAQ	F	p
zwischen	630.46	3	210.13	3.791	0.0121
den Gruppen					
innerhalb	7040.05	127	55.43	-	-
der Gruppen					
gesamt	7670.51	142	-	-	-

8.5 Die Kryokonservierung von Mäuseembryonen

Im folgenden werden nur $n \times m$ - Feldertests dargestellt. Neben den Absolutzahlen wird in jeder Zelle auch die prozentuale Zeilen- und Spaltenhäufigkeit angegeben. In den Tabellen zu den Transferergebnissen sind die Angaben für trächtig gewordene Empfänger enthalten, darunter ist jedoch auch die Zahl der insgesamt transferierten Embryonen und die Zahl der Empfängertiere dokumentiert.

n := Absolutbetrag der Zelle
R% := Prozentuale Reihenhäufigkeit
S% := Prozentuale Spaltenhäufigkeit

8.5.2 Erste Versuchsreihe

8.5.2.2.1 Wiederfindungsrate

Gruppe	wiedergefunden			Embryonen verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	252	94.7	46.2	14	5.3	41.1	266	100.0	45.9
1 S	293	93.6	53.8	20	6.4	48.9	313	100.0	54.1
alle	545	94.1	100.0	34	5.9	100.0	579	100.0	100.0
	X = 0.3302			p = 0.70					

8.5.2.2.2 Der Anteil morphologisch intakter Embryonen

Gruppe	morpholog. intakt			Embryonen geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	122	48.4	39.1	130	51.6	55.8	252	100.0	46.2
1 S	190	64.8	60.9	103	35.2	44.2	193	100.0	53.8
alle	312	57.2	100.0	233	42.8	100.0	545	100.0	100.0
	X = 14.9495			p < 0.001					

8.5.2.2.3 Die kulturelle Weiterentwicklung

Gruppe	weiterentwickelt			Embryonen abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	32	16.7	31.4	160	83.3	52.5	192	100.0	47.2
1 S	70	32.6	68.6	145	67.4	47.5	215	100.0	52.8
alle	102	25.1	100.0	305	74.9	100.0	407	100.0	100.0
	X = 13.6384			p < 0.001					

8.5.2.2.4 Die Transferergebnisse

Gruppe	implantiert			Embryonen abgestorben			transferiert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	31	51.7	42.5	29	48.3	46.0	60	100.0	44.1
1 S	42	55.3	57.5	34	54.7	54.0	76	100.0	55.9
alle	73	53.7	100.0	48	35.3	100.0	136	100.0	100.0
	X = 0.1744			p = 0.70					

Insgesamt wurden transferiert:

- 1 K : 73 Embryonen auf 9 Empfänger, davon wurden 9 trächtig
 1 S : 81 Embryonen auf 9 Empfänger, davon wurden 8 trächtig

Gruppe	Lebende Junge			Embryonen			transferiert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	23	38.3	47.9	37	61.7	42.0	60	100.0	44.1
1 S	25	32.9	52.1	51	67.1	58.0	76	100.0	55.9
alle	48	35.3	100.0	88	64.7	100.0	136	100.0	100.0
	X = 0.4343			p = 0.70					

8.5.3 Die zweite Versuchsreihe

8.5.3.2.1 Die Wiederfindungsrate

Gruppe	wiedergefunden			Embryonen verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	237	96.3	31.9	9	3.7	18.4	246	100.0	31.8
2 B	253	94.1	34.0	16	5.9	32.7	269	100.0	33.9
2 C	254	91.4	34.1	24	8.6	49.0	278	100.0	35.1
alle	744	93.8	100.0	49	6.2	100.0	793	100.0	100.0
	X = 5.6085			p = 0.10					

8.5.3.2.2 Der Anteil intakter Embryonen nach dem Auftauen

Gruppe	morpholog. intakt			Embryonen geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	163	68.8	29.3	74	31.2	39.4	237	100.0	31.9
2 B	183	72.3	32.9	70	27.7	37.2	253	100.0	34.0
2 C	210	82.7	37.8	44	17.3	23.4	254	100.0	34.1
alle	556	74.7	100.0	188	25.3	100.0	744	100.0	100.0
gesamt	X = 13.7142			p < 0.01					
2A:2B	X = 0.7455			p = 0.50					
2A:2C	X = 12.9763			p < 0.001					
2B:2C	X = 7.7828			p < 0.01					

8.5.3.2.3 Die in vitro Entwicklung

Gruppe	weiterentwickelt			Embryonen abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	108	59.7	33.7	73	40.3	32.6	181	100.0	33.1
2 B	102	55.1	31.6	83	44.9	37.1	185	100.0	33.8
2 C	113	62.4	35.0	68	37.6	30.4	181	100.0	33.1
alle	323	59.0	100.0	224	41.0	100.0	547	100.0	100.0
	X = 2.0568			p = 0.50					

8.5.3.2.4 Die Transferergebnisse

Gruppe	implantiert			Embryonen abgestorben			transferiert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	27	62.8	28.4	16	37.2	22.9	43	100.0	26.1
2 B	22	44.9	23.2	27	55.1	38.6	49	100.0	29.7
2 C	46	63.0	48.4	27	37.0	38.6	73	100.0	44.2
alle	95	57.6	100.0	70	42.4	100.0	165	100.0	100.0
	X = 4.5868			p = 0.20					

Insgesamt wurden transferiert:

- 2 A 56 Embryonen auf 7 Empfänger, davon wurden 6 trüchtig
- 2 B 61 Embryonen auf 7 Empfänger, davon wurden 6 trüchtig
- 2 C 73 Embryonen auf 6 Empfänger, davon wurden 6 trüchtig

Gruppe	Lebende Junge			Embryonen abgestorben			transferiert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	4	9.3	14.3	39	90.7	28.5	43	100.0	26.1
2 B	6	12.2	21.4	43	87.8	31.4	49	100.0	29.7
2 C	18	24.7	64.3	55	75.3	40.1	73	100.0	44.2
alle	28	17.0	100.0	137	83.0	100.0	165	100.0	100.0
	X = 5.6326			p = 0.10					

8.5.4 Der Vergleich der verschiedenen Embryonalstadien

8.5.4.1 Erste Versuchsreihe

** 1. Morulae

Gruppe	wiedergefunden			Morulae verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	140	94.6	48.4	8	5.2	50.0	148	100.0	48.5
1 S	149	94.9	51.6	8	5.1	50.0	157	100.0	51.5
alle	289	94.8	100.0	16	5.2	100.0	305	100.0	100.0
	X = 0.0147			p = 99.98					

	morpholog. intakt			Morulae geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	79	56.4	39.1	61	43.6	70.1	140	100.0	48.4
1 S	123	82.6	60.9	26	17.4	29.9	149	100.0	51.6
alle	202	69.9	100.0	87	30.1	100.0	289	100.0	100.0
	X = 23.4070			p < 0.001					
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	16	15.8	32.0	85	84.2	56.3	101	100.0	50.2
1 S	34	34.0	68.0	66	66.0	43.7	100	100.0	49.8
alle	50	24.9	100.0	151	75.1	100.0	201	100.0	100.0
	X = 8.8660			p < 0.01					

**** 2. Junge Blastozysten**

Gruppe	wiedergefunden			Junge Blastozysten verloren			tiefgefroren	
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	S%
1 K	32	94.1	34.8	2	5.9	33.3	34	34.7
1 S	60	93.8	65.2	4	6.3	66.7	64	65.3
alle	92	93.9	100.0	6	6.1	100.0	98	100.0
	X = 0.0052			p = 99.98				
	morpholog. intakt			geschädigt			wiedergefunden	
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	S%
1 K	21	65.6	30.0	11	34.4	50.0	32	34.0
1 S	49	81.7	70.0	11	18.3	50.0	60	65.2
alle	70	76.1	100.0	22	23.9	100.0	92	100.0
	X = 2.9517			p < 0.10				
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert	
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	S%
1 K	10	41.7	29.4	14	58.3	63.6	24	42.9
1 S	24	75.0	70.6	8	25.0	36.4	32	57.1
alle	34	60.7	100.0	22	39.3	100.0	56	100.0
	X = 6.3886			p < 0.02				

** 3. Blastozysten

Gruppe	Blastozysten								
	wiedergefunden			verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	40	95.2	52.6	2	4.8	66.7	42	100.0	53.2
1 S	36	97.3	47.4	1	2.7	33.3	37	100.0	46.8
alle	76	96.2	100.0	3	3.8	100.0	79	100.0	100.0
	X = 0.2283			p < 0.70					
	morpholog. intakt			geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	14	35.0	50.0	26	65.0	54.2	40	100.0	52.6
1 S	14	38.9	50.0	22	61.1	45.8	36	100.0	47.8
alle	28	36.6	100.0	48	63.2	100.0	76	100.0	100.0
	X = 0.1231			p = 0.90					
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	5	16.1	29.4	26	83.9	56.5	31	100.0	49.2
1 S	12	37.5	70.6	20	62.5	43.5	32	100.0	50.8
alle	17	27.0	100.0	46	73.0	100.0	63	100.0	100.0
	X = 3.6500			p < 0.10					

** 4. Expandierte Blastozysten

Gruppe	Expandierte Blastozysten								
	wiedergefunden			verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	40	95.2	45.5	2	4.8	22.2	42	100.0	43.3
1 S	48	87.3	54.5	7	12.7	77.8	55	100.0	56.7
alle	88	90.7	100.0	9	9.3	100.0	97	100.0	100.0
	X = 1.7950			p < 0.20					
	morpholog. intakt			geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	6	15.8	60.0	34	85.0	43.6	40	100.0	45.5
1 S	4	8.3	40.0	44	91.7	56.4	48	100.0	54.5
alle	10	11.4	100.0	78	88.6	100.0	88	100.0	100.0
	X = 0.1503			p = 0.30					

	Expandierte Blastozysten								
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
1 K	1	2.7	100.0	36	97.3	42.9	37	100.0	43.5
1 S	0	0.0	0.0	48	100.0	57.1	48	100.0	56.5
alle	1	1.2	100.0	84	98.8	100.0	85	100.0	100.0
	X = 1.3127			p < 0.30					

8.5.4.2 Zweite Versuchsreihe

** 1. Morulae

Gruppe	wiedergefunden			Morulae verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	104	95.4	33.3	5	4.6	31.3	109	100.0	33.2
2 B	110	94.8	35.3	6	5.2	37.5	116	100.0	35.4
2 C	98	95.1	31.4	5	4.9	31.3	103	100.0	31.4
alle	312	95.1	100.0	16	4.9	100.0	328	100.0	100.0
	X = 0.0417			p < 99.98					
	morpholog. intakt			geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	82	78.8	30.1	22	21.2	55.0	104	100.0	33.3
2 B	95	86.4	34.9	15	13.6	37.5	110	100.0	35.3
2 C	95	97.0	34.9	3	3.0	7.5	98	100.0	31.4
alle	272	87.2	100.0	40	12.8	100.0	312	100.0	100.0
	X = 23.4070			p < 0.001					
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	45	61.6	35.7	28	38.4	35.4	73	100.0	35.6
2 B	49	67.1	38.4	24	32.9	30.4	73	100.0	35.6
2 C	32	54.2	25.4	27	45.8	34.2	59	100.0	31.4
alle	126	61.5	100.0	79	38.5	100.0	205	100.0	100.0
	X = 2.2890			p = 0.50					

**** 2. Junge Blastozysten**

Gruppe	wiedergefunden			Junge Blastozysten					
	n	R%	S%	verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	70	94.6	31.5	4	5.4	100.0	74	100.0	32.7
2 B	70	100.0	31.5	0	0.0	0.0	70	100.0	31.0
2 C	82	100.0	36.9	0	0.0	0.0	82	100.0	36.3
alle	222	98.2	100.0	4	1.8	100.0	226	100.0	100.0
	X = 8.3643			p < 0.02					
	morpholog. intakt			geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	63	90.0	31.3	7	10.0	33.3	70	100.0	31.5
2 B	61	87.1	30.3	9	12.9	42.9	70	100.0	31.5
2 C	77	93.9	38.3	5	6.1	23.8	82	100.0	36.9
alle	201	90.5	100.0	21	9.5	100.0	222	100.0	100.0
	X = 2.0495			p < 0.50					
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	38	84.4	34.9	7	15.6	29.2	45	100.0	33.8
2 B	31	79.5	28.4	8	20.5	33.3	39	100.0	29.3
2 C	40	81.6	36.7	9	18.4	37.5	49	100.0	36.8
alle	109	82.0	100.0	24	18.0	100.0	133	100.0	100.0
	X = 0.3556			p < 0.90					

**** 3. Blastozysten**

Gruppe	wiedergefunden			Blastozysten verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	32	97.0	28.3	1	3.0	11.1	33	100.0	27.0
2 B	48	96.0	42.5	2	4.0	22.2	50	100.0	41.0
2 C	33	84.6	29.2	6	15.4	66.7	39	100.0	32.0
alle	113	92.6	100.0	9	7.4	100.0	122	100.0	100.0
	X = 5.4069			p < 0.10					

	morpholog. intakt			Blastozysten geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	17	53.1	27.9	15	46.9	28.8	32	100.0	28.3
2 B	23	47.9	37.7	25	52.1	48.1	48	100.0	42.5
2 C	21	63.6	34.4	12	36.4	23.1	33	100.0	29.2
alle	61	54.0	100.0	52	46.0	100.0	113	100.0	100.0
	X = 1.9585			p < 0.50					
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	20	62.5	32.8	12	37.5	23.5	32	100.0	28.6
2 B	15	31.3	24.6	33	68.8	64.7	48	100.0	42.8
2 C	26	81.3	42.6	6	18.8	11.8	32	100.0	28.6
alle	61	54.5	100.0	51	45.5	100.0	112	100.0	100.0
	X = 20.5207			p < 0.001					

**** 4. Expandierte Blastozysten**

Gruppe	Expandierte Blastozysten								
	wiedergefunden			verloren			tiefgefroren		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	31	91.2	32.0	3	8.8	14.3	34	100.0	28.8
2 B	25	86.2	25.8	4	13.8	19.0	29	100.0	24.6
2 C	41	74.5	42.3	14	25.5	66.7	55	100.0	46.6
alle	97	82.2	100.0	21	17.8	100.0	118	100.0	100.0
	X = 4.3937			p < 0.20					
	morpholog. intakt			geschädigt			wiedergefunden		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	1	3.2	4.5	30	96.8	40.0	31	100.0	32.0
2 B	4	16.0	18.2	21	84.0	28.0	25	100.0	25.8
2 C	17	41.5	77.3	24	58.5	32.0	41	100.0	42.3
alle	22	22.7	100.0	75	77.3	100.0	97	100.0	100.0
	X = 15.5753			p < 0.001					

	Expandierte Blastozysten								
	weiterentwickelt			abgestorben			kultiviert		
	n	R%	S%	n	R%	S%	n	R%	S%
2 A	3	9.7	12.0	28	90.3	38.9	31	100.0	32.0
2 B	7	28.0	28.0	18	72.0	25.0	25	100.0	25.8
2 C	15	36.6	60.0	26	63.4	36.1	41	100.0	42.3
alle	25	25.8	100.0	72	74.2	100.0	97	100.0	100.0
	X = 6.7684			p < 0.05					

8.5.4.3 Gegenüberstellung der beiden Versuchsreihen

In diesem letzten Abschnitt werden die Ergebnisse der Chi-Quadrat-Tests zwischen verschiedenen Zellen der Tabelle 14 vorgestellt.

** 1. gesamte Tabelle 14

Anzahl der Zeilen : 20 / Anzahl der Spalten : 2 / FG : 19
X = 399.4740 / p < 0.001

** 2. Unterschied Versuchsreihen - alle Stadien

Anzahl der Zeilen : 5 / Anzahl der Spalten : 2 / FG : 4
X = 72.1305 / p < 0.001

** 3. Unterschiede innerhalb der einzelnen Stadien

Morulae : 5 Zeilen / 2 Spalten / 4 FG
X = 66.4205 p < 0.001
Junge Blastozysten : 5 Zeilen / 2 Spalten / 4 FG
X = 17.5261 p < 0.01
Blastozysten : 5 Zeilen / 2 Spalten / 4 FG
X = 7.4256 p < 0.20
Expandierte Blastozysten : 5 Zeilen / 2 Spalten / 4 FG
X = 22.7037 p < 0.001

** 4. Unterschiede zwischen den Stadien innerhalb der Versuchsreihen

Versuchsgruppe	X	p
1 K	23.2087	< 0.001
1 S	105.8230	< 0.001
2 A	85.2727	< 0.001
2 B	72.4328	< 0.001
2 C	78.1111	< 0.001

**** 5. Unterschiede der "kontaktgeseedeten" zu den
"selbstseedenden" Embryonen**

Alle Stadien

	X	p
1 K : 1 S	14.9495	< 0.001
: 2 A	20.8303	< 0.001
: 2 B	30.1981	< 0.001
: 2 C	65.8241	< 0.001

Morulae

	X	p
1 K : 1 S	23.4070	< 0.001
: 2 A	13.3606	< 0.001
: 2 B	26.0891	< 0.001
: 2 C	48.1205	< 0.001

Junge Blastozysten

	X	p
1 K : 1 S	2.9517	< 0.10
: 2 A	8.9781	< 0.01
: 2 B	6.4906	< 0.02
: 2 C	15.2547	< 0.001

Blastozysten

	X	p
1 K : 1 S	0.1231	< 0.90
: 2 A	2.3821	< 0.20
: 2 B	1.4939	< 0.30
: 2 C	5.9413	< 0.02

Expandierte Blastozysten

	X	p
1 K : 1 S	2.5216	< 0.20
: 2 A	4.4395	< 0.05
: 2 B	0.1635	< 0.70
: 2 C	4.3712	< 0.05

9 Literaturverzeichnis

1. ADAM, G. (1970)
Die Steuerung des Ionentransportes durch die Zellmembran
Konstanz, Universitätsverlag, 1970
2. AL HASANI, S., S. TROTNOW und M. BARTHEL (1982)
Kryokonservierung von Kaninchenembryonen des
8-Zellstadiums im automatisierten "Offenen System"
Geburtshilfe u. Frauenheilkunde, 1982, 848-852
3. AL HASANI, S., S. TROTNOW und M. KÖHNLEIN (1983)
Kryokonservierung von Mäuseembryonen nach dem Zwei-
Stufen-Verfahren im automatisierten "Offenen System"
Zuchthyg., 18, 1983, 7-13
4. ALI MANSOORI, G. (1975)
Kinetics of water loss from cells at subzero centigrade
temperatures
Cryobiology, 12, 1975, 34-45
5. AMU, T.C. (1978)
Diffusion in dilute solutions: An experimental study
with special reference to the effect of size and shape
of solute and solvent molecules
Universität Uppsala, 1978, Diss.
6. ANDERSON, E. (1977)
Diskussionsbeitrag in "General discussion"
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 222ff
7. ASHWOOD-SMITH, M.J. (1961)
Preservation of mouse bone marrow at -79°C with
Dimethyl Sulphoxide
Nature, 190, 1961, 1204-1205
8. ASWOOD-SMITH, J.M. und E. GRANT (1977)
Genetic stability in cellular systems in the frozen state
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 251-272

9. ASHWOOD-SMITH, M.J. und G.B. FRIEDMANN (1979)
Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing,
storage time, and X-irradiation on mammalian cells pre-
served at -196°C in Dimethyl Sulphoxide
Cryobiology, 16, 1979, 132-140
10. BADER, H. (1972)
Morphologische, physikalische und chemische Grundlagen
der Zellmembran
in: GAUER, KRAMER, JUNG (Hrsgg.): Physiologie des Menschen,
Bd. 1, Bioenergetik, München, Berlin, Wien, 1977, S. 177-224
11. BAILEY, D.W. (1977)
Genetic drift: the problem and its possible solution by
frozen-embryo storage
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.): The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 291-304
12. BANK, H. (1973)
Visualization of freezing damage. II. Structural altera-
tions during warming
Cryobiology, 10, 1973, 157-170
13. BANK, H. (1977)
Diskussionsbeitrag in "General discussion"
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.): The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 222ff
14. BANK, H. und P. MAZUR (1970)
The effect of freezing and thawing on the ultrastructure
and viability of tissue culture cells
Cryobiology, 6, 1970, 580 (Abstr.)
15. BANK, H. und R.R. MAURER (1974)
Survival of frozen rabbit embryos
Experimental Cell Research, 89, 1974, 188-196
16. BANK, H. und R.R. MAURER (1976)
Cryogenic preservation of eight-celled and morula staged
rabbit embryos
in: MÜHLBOCK, O. (Hrsg.): Proceedings of the workshop on
basic aspects of freeze preservation of mouse strains
Stuttgart, Fischer Verlag, 1976, S. 35-43

17. BARNETT, R.E. (1978)
The effects of Dimethyl Sulphoxide and Glycerol on
Na-K-ATPase and membrane structure
Cryobiology, 15, 1978, 227-229
18. BEELER, C.R. (1981)
Controlling cooling rates with a variable vacuum in a
Dewar flask
Cryobiology, 18, 1981, 79-81
19. BERG, L. und F.S. SOLIMAN (1969)
Composing and pH changes during freezing of solutions
containing Ca and Mg phosphate
Cryobiology, 6, 1969, 10-14
20. BERG, L. und F.S. SOLIMAN (1969)
Effect of Glycerol and Dimethyl Sulphoxide on changes in
composition and pH of buffer salt solutions during
freezing
Cryobiology, 6, 1969, 93-97
21. BEUTEL, P., H. KÜFFNER und W. SCHUBÖ (1980)
SPSS 8 - Statistik-Programm-System für die
Sozialwissenschaften
Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1980
22. BIGGERS, J.D. und R.L. BRINSTER (1965)
Biometrical problems in the study of early mammalian
embryos in vitro
J. Exp. Zool., 158, 1965, 39-48
23. BIGGERS, J.D., R.M. BORLAND und R.D. POWERS (1977)
Transport mechanisms in the preimplantation mammalian
embryo
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 129-153
24. BILTON, R.J. (1980)
Preservation of embryos of the large domestic species
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid, 1980, 2, 245-253

25. BILTON, R.J. und N.W. MOORE (1976)
Effects of ice seeding and of freezing and thawing rate
on the development of sheep embryos stored at -196°C
Theriogenology, 6, 1976, 635
26. BILTON, R.J. und N.W. MOORE (1977)
Successful transport of frozen cattle embryos from
New Zealand to Australia
J. Reprod. Fert., 50, 1977, 363-364
27. BLOSS, F.D. (1971)
Crystallography and crystal chemistry - an introduction
New York, Chicago, Holt, Rinehart & Winston, 1971
28. BOUYSSOU, B. und D. CHUPIN (1982)
Two-step freezing of cattle blastocysts in French-straws
Theriogenology, 17, 1982, 80
29. BREGULLA, K. (1980)
Die Gefrierkonservierung der menschlichen Ei- und
Spermazellen
Gynäkol. Prax., 4, 1980, 243-261
30. BRETH-HANSEN, H. (1976)
Pregnancy rate in cattle in relation to oestrus syn-
chronisation and cell stages
in : ROWSON, L.E.A. (Hrsg.): Egg transfer in cattle, EEC-
Seminar, Cambridge, Com. of the europ. comm., EUR 5491,
S. 223-227, zitiert nach NIEMANN, H. (siehe 160)
31. BRETZEL, R.G., J. SCHNEIDER, T. ZEKORN, K. FEDERLIN (1980)
Gefrierkonservierung (-196°C) tierischer und
menschlicher Pankreasinseln zur Transplantation bei
Diabetes mellitus
Verh. d. Dt. Ges. f. Innere Med. 86. Band,
München, Bergmann Verlag, 1980, 1003-1007
32. BRETZEL, R.G., J. SCHNEIDER, J. DOBROSCHKE, K. SCHWEMMLE,
E.F. PFEIFFER und K. FEDERLIN (1980)
Islet transplantation in experimental diabetes of the rat
VII. Cryopreservation of rat and human islets.
Preliminary Results
Horm. Metab. Res., 12, 1980, 274-275

33. BRETZEL, R.G. und K. FEDERLIN (1982)
Inseltransplantation beim Diabetiker - Ziel in Sicht?
Klinikerzt, 11, 1982, 34-47
34. BRINSTER, R.L. (1965)
Studies on the development of mouse embryos in vitro.
I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration
J. Exp. Zool., 158, 1965, 49-58
36. BRINSTER, R.L. (1965)
Studies on the development of mouse embryos in vitro.
III. The effect of fixed nitrogen sources
J. Exp. Zool., 158, 1965, 69-78
37. BRINSTER, R.L. (1965)
Studies on the development of mouse embryos in vitro.
IV. Interactions of energy sources
J. Reprod. Fert., 10, 1965, 227-240
38. BURKS, J.L., E. DAVIS, A.H. BAKKEN, J.J. TOMASOVIC (1965)
Morphologic evaluation of frozen rabbit and human ova
Fertility and Sterility, 16, 1965, 638-641
39. CHANG, M.C. (1947)
Normal development of fertilized rabbit ova stored at
low temperature for several days
Nature, 159, 1947, 602-603
40. CHANG, M.C. (1948)
Transplantation of fertilized rabbit ova:
the effect on viability of age, in vitro storage period,
and storage temperature
Nature, 161, 1948, 978-979
41. CHANG, M.C. (1948)
Probability of normal development after transplantation
of fertilized rabbit ova stored at different temperatures
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68, 1948, 680-683
42. CHANG, M.C. (1948)
The effect of low temperature on fertilized rabbit ova
in vitro, and the normal development of ova kept at low
temperature for several days
J. Gen. Phys., 31, 1948, 385-413

43. CHANG, M.C. (1950)
Transplantation of rabbit blastocysts at late stage:
probability of normal development and viability at low
temperature
Science, 111, 1950, 544-545
44. CHANG, M.C. (1953)
Storage of unfertilized rabbit ova: subsequent
fertilization and the probability of normal development
Nature, 172, 1953, 353-354
45. DAW, A., J. FARRANT und G.J. MORRIS (1973)
Membrane leakage of solutes after thermal shock or
freezing
Cryobiology, 10, 1973, 126-133
46. DICK, D.A.T. (1966)
Cell water
London, Butterworth, 1966
47. DILLER, K.R. (1975)
Intracellular freezing: effect of extracellular super-
cooling
Cryobiology, 12, 1975, 480-485
48. DILLER, K.R. und E.G. CRAVALHO (1971)
A cryomicroscope for the study of freezing and thawing
processes in biological cells
Cryobiology, 7, 1971, 191-199
49. DILLER, K.R., E.G. CRAVALHO und C.E. HUGGINS (1972)
Intracellular freezing in biomaterials
Cryobiology, 9, 1972, 429-440
50. DILLER, K.R., E.G. CRAVALHO, C.E. HUGGINS (1973)
The effect of supercooling on frozen erythrocytes
Cryobiology, 10, 1973, 519 (Abstr.)
51. DITTRICH, F. (1982)
Persönliche Mitteilung

52. DITTRICH, F., S. TROTNOW und C. WURMTHALER (1982)
Erlanger Kryokonservierungstechnik - Automatisierung des
offenen Gefriersystemes mit Selbstauslösung des Seeding
Verhandlungsbericht der VII. Veterinär-Humanmedizinischen
Tagung, 18.-20.Feb.1982, Gießen, S.56-60

53. DROST, M., G. ANDERSON, P. CUPPS, M. HORTON, P. WARNER
und R. WRIGHT (1975)
A field study on embryo transfer in cattle
J.Am.vet.med.Ass.,166,1975,1176-1179,
zitiert nach NIEMANN (siehe 160)

54. EDIDIN, M. und V.A. PETIT (1977)
The effect of temperature on the lateral diffusion of
plasma membrane proteins
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam,Elsevier North-Holland,1977, S. 155-174

55. EDWARDS, G.G. und P.C. STEPTOE (1977)
The relevance of the frozen storage of human embryos
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam,Elsevier North-Holland,1977, S.235-250

56. ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) (1977)
The freezing of mammalian embryos
Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series)
Amsterdam,Elsevier North-Holland,1977

57. ELSDEN, R.P., L.D. NELSON und G.E. SEIDEL (1978)
Superovulating cows with follicle stimulating hormone
and pregnant mare's serum gonadotropine
Theriogenology,9,1978,17-26

58. FAHY, G. (1981)
Simplified calculation of cell water content during
freezing and thawing in nonideal solutions of
cryoprotective agents and its possible application to
the study of "solution effect" injury
Cryobiology,18,1981,473-482

59. FARRANT, J. und A.E. WOOLGAR (1968)
Preliminary quantitative analysis of the effect of protective compounds on the physical mechanisms leading to freezing damage
Cryobiology, 4, 1968, 248 (Abstr.)
60. FARRANT, J. und G.J. MORRIS (1973)
Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury
Cryobiology, 10, 1973, 134-140
61. FARRANT, J., H. LEE und C.A. WALTER (1977)
Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cells
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 49-91
62. FARRANT, J., C.A. WALTER, H. LEE und L.E. MCGANN (1977)
Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing
Cryobiology, 14, 1977, 273-286
63. FISER, P.S. und J.W. MACPHERSON (1976)
Effect of cooling rate on freezing of mouse embryos
Can. J. Anim. Sci., 56, 1976, 833 (Abstr.)
64. FORGRAVE, L.F., P. RAJAMAHENDRAN und R.D. BAKER (1977)
Cryopreservation of mouse embryos in MacDonald freeze-thaw apparatus
Ca. J. Anim. Sci., 57, 1977, 389-394
65. GAUER, O.H., K. KRAMER, R. JUNG (Hrsgg.) (1972)
Physiologie des Menschen - Band 1: Bioenergetik
München, Berlin, Wien, Urban & Schwarzenberg, 1972
66. GÖRDING, G. (1980)
Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Mäuseblastozysten mit Glycerin als Gefrierschutzmittel
Tierärztl. Hochschule Hannover, 1980, Diss.
67. GÖRLACH, A., J. HAHN und R. HAHN (1981)
Die Tiefgefrierkonservierung von Rinderembryonen im offenen System (Einfrieranlage "Modell Neustadt/Aisch")
Zuchthyg., 16, 1981, 88

68. GREVE, T. und H. LEHN-JENSEN (1979)
Current status of embryo-transplantation in Denmark
Theriogenology, 11, 1979, 99

69. GRIFFITHS, J.B., C.S. COX, D.J. BEADLE, C.J. HUNT und D.S. REID (1979)
Changes in cell size during the cooling, warming and post-thawing periods of the freeze-thaw cycle
Cryobiology, 16, 1979, 141-151

70. GUTMANN, V. und E. HENGGE (1974)
Allgemeine und anorganische Chemie
Weinheim, Verlag Chemie, 1974

71. HAHN, J. (1980)
The problems and future possibilities of up-to date bovine embryo preservation
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I. Madrid 1980, 2, 263-267

72. HAHN, J., U. SCHNEIDER, R. ROSELIUS, W. ROMANOWSKI (1981)
Transferergebnisse mit gefrorenen/aufgetauten Rinderembryonen unter Benutzung des Einfriergerätes Keltorr 2080
Zuchthyg., 16, 1981, 88-89

73. HEBER, U. (1968)
Freezing injury in relation to loss of enzyme activities and protection against freezing
Cryobiology, 5, 1968, 188-201

74. HEISE, J. (1979)
Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Mäusezygoten unter Berücksichtigung der Äquilibrationsdauer und hoher Einfriereschwindigkeiten
Tierärztl. Hochschule Hannover, 1979, Diss.

75. HELDT, H.W. (1972)
Morphologische und funktionelle Kompartimentierung des Zellstoffwechsels
in: GAUER, KRAMER, JUNG (Hrsgg.): Physiologie des Menschen, Bd. 1, München, Berlin, Wien, 1972, S. 225-270

76. HENNIG, H., M. WEISSENFELS und H. FRANZ (1976)
Grundlagen der Chemie für Mediziner
Leipzig, Joh. Ambr. Barth, 1976

77. HÜNLICH, L.A.T. (1982)
Versuche zur Kryokonservierung, Kultur und Transfer
von Säugerembryonen am Beispiel der Maus
Universität Erlangen, 1982, Diss.
78. HULTIN, E. und B. HAGSTRÖM (1953)
Sea-urchin eggs survive deep-freezing
Arkiv för Zoologi, Bd.6, Nr.26, 523-525
79. JACKOWSKI, S.C. (1977)
Physiological differences between fertilized and un-
fertilized mouse ova: Glycerol permeability and freezing
sensitivity
Knoxville, University of Tennessee, PhD Diss. 1977
80. JACKOWSKI, S.C. und S.P. LEIBO (1976)
Response of fertilized mouse ova to freezing and thawing
as a function of permeation by Glycerol
Cryobiology, 13, 1976, 646 (Abstr.)
81. JACKOWSKI, S.C., S.P. LEIBO und P. MAZUR (1980)
Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized
mouse ova
J. Exp. Zool., 212, 1980, 329-341
82. KASAI, M., K. NIWA und A. IRITANI (1978)
Fertilization in vitro of frozen mouse oocytes
Cryobiology, 15, 1978, 689 (Abstr.)
83. KASAI, M., A. IRITANI und M.C. CHANG (1979)
Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after
freezing and thawing
Biology of Reproduction, 21, 1979, 839-844
84. KASAI, M., K. NIWA und A. IRITANI (1980)
Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly
J. Reprod. Fert., 59, 1980, 51-56
85. KASAI, M., K. NIWA und A. IRITANI (1981)
Effects of various cryoprotective agents on the survival
of unfrozen and frozen mouse embryos
J. Reprod. Fert., 63, 1981, 175-180

86. KLEBER, W. (1970)
Einführung in die Kristallographie
Berlin, VEB Verlag Technik, 1970
87. KLEIN, J. (1977)
A mouse geneticist's impatient waiting for the arrival of
embryo-freezing techniques
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S.305-316
88. KLOTZ, I. (1971)
Energetik biochemischer Reaktionen - Eine Einführung
Stuttgart, Thieme Verlag, 1971
89. KUHN, A. (1974)
Tiefgefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen
Ludwig-Maximilian Universität München, 1974, Diss.
90. KUHN, A. (1976)
Der Einfluß der Auftaugeschwindigkeit für das Überleben
tiefgefrorener Eizellen
Extracorp. Befruchtung und Implantation - Berichte über
wiss. Sitzungen, Hannover, 1976, 25-27
91. LEHN-JENSEN, H. (1980)
Deep freezing of cattle embryos utilizing different
freezing curves and cryoprotectants
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980, 2, 461 (Abstr.)
92. LEHN-JENSEN, H. und T. GREVE (1978)
Low temperature preservation of cattle blastocysts
Theriogenology, 9, 1978, 313-322
93. LEHN-JENSEN, H. und T. GREVE (1980)
Preservation of bovine blastocysts in liquid nitrogen
using two different freezing/thawing rates and DMSO/
Glycerol as cryoprotectants
Theriogenology, 13, 1980, 100
94. LEHN-JENSEN, H. und T. GREVE (1982)
The survival of cow blastocysts in 1.4 M Glycerol after
plugging between -15 and -60°C and rapid thawing
Theriogenology, 17, 1982, 95

95. LEIBO, S.P. (1976)
Sensitivity of mouse embryos to freezing and thawing
in: MÜHLBOCK, O. (Hrsg.): Basic aspects of freeze
preservation of mouse strains (Proc.)
Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1976
96. LEIBO, S.P. (1976)
Nucleation temperatures of intracellular ice formation in
mouse ova
Cryobiology, 13, 1976, 646 (Abstr.)
97. LEIBO, S.P. (1976)
Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using
Glycerol concentration changes at subzero temperatures
Cryobiology, 13, 1976, 587-598
98. LEIBO, S.P. (1977)
Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 69-96
99. LEIBO, S.P. (1980)
Water permeability and its activation energy of
fertilized and unfertilized mouse ova
J. Membr. Biol., 53, 1980, 179-188
100. LEIBO, S.P., P. MAZUR, J. FARRANT und E.H.Y. CHU (1970)
Freezing of a nucleated mammalian cell: interactions of
cooling and warming rates in the presence of PVP, Sucrose
Glycerol or DMSO
Cryobiology, 6, 1970, 269 (Abstr.)
101. LEIBO, S.P. und P. MAZUR (1970)
The role of cooling rates in low temperature preservation
Cryobiology, 6, 1970, 593 (Abstr.)
102. LEIBO, S.P., P. MAZUR und E.H.Y. CHU (1970)
Two factors responsible for freezing injury in hamster
tissue culture cells
Cryobiology, 6, 1970, 580 (Abstr.)

103. LEIBO, S.P., J. FARRANT, P. MAZUR, J.R. HANNA, L.H. SMITH (1970)
Effects of freezing on marrow stem cell suspensions:
interactions of cooling and warming rates in the presence
of PVP, Sucrose or Glycerol
Cryobiology, 6, 1970, 315-332
104. LEIBO, S.P. und P. MAZUR (1971)
The role of cooling rates in low-temperature preservation
Cryobiology, 8, 1971, 447-452
105. LEIBO, S.P., P. MAZUR und S.C. JACKOWSKI (1974)
Factores affecting survival of mouse embryos during
freezing and thawing
Exp. Cell Res., 89, 1974, 79-88
106. LEIBO, S.P., J.J. MCGRATH und E.G. CRAVALHO (1975)
Microscopic observation of intracellular ice formation
in unfertilized mouse ova as a function of cooling rates
Cryobiology, 12, 1975, 579 (Abstr.)
107. LEIBO, S.P., J.J. MCGRATH und E.G. CRAVALHO (1978)
Microscopic observation of intracellular ice formation
in unfertilized mouse ova as a function of cooling rates
Cryobiology, 15, 1978, 257-271
108. LEIBO, S.P. und P. MAZUR (1978)
Methods for the preservation of mammalian embryos by
freezing
in: DANIEL, J.C. (Hrsg.): Methods in mammalian
reproduction, New York, San Francisco, London,
Academic Press, 1978, S. 178-201
109. LEVIN, R.L. (1978)
The water permeability of yeast cells at subzero
temperatures
Cryobiology, 15, 1978, 584 (Abstr.)
110. LIN, T.P., J.K. SHERMAN und E.L. WILLETT (1957)
Survival of unfertilized mouse eggs in media containing
Glycerol and Glycine
J. Exp. Zool., 134, 1957, 275-292

111. LING, G.N. (1970)
Intracellular water and its relation to proteins and
membranes
Cryobiology, 6, 1970, 584 (Abstr.)
112. LING, G.N. und C.L. TIEN (1970)
Fundamental studies of cell freezing and dehydration
phenomena
Cryobiology, 6, 1970, 575 (Abstr.)
113. LOCKWOOD, A.P.M. (1980)
Membranen tierischer Zellen
Stuttgart, Teubner Verlag, 1980
114. LOVELOCK, J.E. (1953)
The haemolysis of human red blood-cells by freezing and
thawing
Biochimica et Biophysica Acta, 10, 1953, 414-426
115. LOVELOCK, J.E. (1953)
Het mechanism of the protective action of Glycerol
against haemolysis by freezing and thawing
Biochimica et Biophysica Acta, 11, 1953, 28-36
116. LOVELOCK, J.E. (1954)
Biophysical aspects of the freezing and thawing of
living cells
Proc. of the Royal Soc. of Med., 47, 1954, 60-62
117. LOVELOCK, J.E. (1954)
Physical instability and thermal shock in red cells
Nature, 173, 1954, 659-661
118. LUYET, B. (1949)
Preservation of formed elements and of proteins of the
blood
American National Red Cross, 1949
119. LUYET, B. und G. RAPATZ (1970)
Study of the distribution of the crystalline and
amorphous phases in aqueous solutions frozen under
various conditions
Cryobiology, 6, 1970, 272 (Abstr.)

120. LUYET, B. und G. RAPATZ (1970)
A review of basic researches on the cryopreservation of
red blood cells
Cryobiology, 6, 1970, 425-481
121. LYON, M., D.G. WHITTINGHAM und P. GLENISTER (1977)
Long-term storage of frozen mouse embryos under increased
background irradiation
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S.273-290
122. MAAS, A. (1981)
Direktbeobachtungen und Analyse von Kristallwachstumsvor-
gängen im hochauflösenden Transmissions-Elektronen-
mikroskop
Opladen, Westdeutscher Verlag, 1981
123. MASSIP, A., P. ZWALMEN, F. ECTORS, R. DE COSTER,
G. D'ETEREN, C. HANZEN und M. DEFONSECA (1979)
Deep freezing of cattle embryos in glass ampules or
French straws
Theriogenology, 12, 1979, 79-84
124. MASSIP, A., F. ECTORS, R. DE COSTER, G. D'ETEREN,
C. HANZEN, P. ZWALMEN und M. DEFONSECA (1980)
Deep freezing of cattle embryos in French straws
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980, 2, 462 (Abstr.)
125. MAURER, R.R. (1978)
Freezing mammalian embryos : a review of the techniques
Theriogenology, 9, 1978, 45-68
126. MAURER, R.R. und J.K. HASEMAN (1976)
Freezing morula stage rabbit embryos
Biology of Reproduction, 14, 1976, 256-263
127. MAZUR, P. (1963)
Kinetics of water loss from cells at subzero
temperatures and the likelihood of intracellular freezing
J. Gen. Physiology, 47, 1963, 347-369

128. MAZUR, P. (1965)
Causes of injury in frozen and thawed cells
Federation Proceedings 24 (Suppl.15), 1965, 175-182
129. MAZUR, P. (1966)
Physical and chemical basis of injury in single-celled
micro-organisms subjected to freezing and thawing
in: MERYMAN, H.T. (Hrsg.): Cryobiology
London, New York, Academic Press, 1966, S. 213-315
130. MAZUR, P. (1970)
Cryobiology. The freezing of biological systems
Science, 168, 1970, 939-949
131. MAZUR, P. (1976)
Freezing and low-temperature storage of living cells
in: MÜHLBOCK, O. (Hrsg.): Proc. of the workshop on basic
aspects of freeze preservation of mouse strains
Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1976, S. 1-12
132. MAZUR, P. (1976)
Diskussionsbeitrag
in: MÜHLBOCK, O. (Hrsg.): Proc. of the workshop on basic
aspects of freeze preservation of mouse strains
Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 1976, S. 42
133. MAZUR, P. (1977)
Slow-freezing injury in mammalian cells
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 19-48
134. MAZUR, P. (1977)
Diskussionsbeitrag in "General discussion"
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 222ff
135. MAZUR, P. (1977)
The role of intracellular freezing in the death of cells
cooled at supraoptimal rates
Cryobiology, 14, 1977, 251-272

136. MAZUR, P. (1980)
Fundamental aspects of the freezing of cells, with
emphasis on mammalian ova and embryos
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980,2,99-114
137. MAZUR, P. und J.J. SCHMIDT (1968)
Interactions of cooling velocity, temperature, and
warming velocity on the survival of frozen and thawed
yeast
Cryobiology,5,1968,1-17
138. MAZUR, P., J. FARRANT, S.P. LEIBO und E.H.Y. CHU (1969)
Survival of hamster tissue culture cells after freezing
and thawing
Cryobiology,6,1969,1-9
139. MAZUR, P., S.P. LEIBO und E.H.Y. CHU (1970)
The survival of hamster tissue culture cells subjected
to extracellular freezing
Cryobiology,6,1970,581 (Abstr.)
140. MAZUR, P., S.P. LEIBO und J. FARRANT (1970)
Comparative effects of cooling rate, warming rate and
protective additive on mammalian cells and yeast
Cryobiology,6,1970,275 (Abstr.)
141. MAZUR, P., S.P. LEIBO und E.H.Y. CHU (1972)
A two factor hypothesis of freezing injury
Exp. Cell Res.,71,1972,345-355
142. MAZUR, P., S.P. LEIBO und R.H. MILLER (1974)
Permeability of the bovine red cell to Glycerol in
hyperosmotic solutions at various temperatures
J. Membr. Biol.,15,1974,107-136
143. MAZUR, P., R.H. MILLER und S.P. LEIBO (1974)
Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function
of the permeation of Glycerol and Sucrose
J. Membr. Biol.,15,1974,137-158

144. MAZUR, P. und R.H. MILLER (1976)
Permeability of the human erythrocyte to Glycerol in
1 and 2 m solutions at 0 or 20 °C
Cryobiology, 13, 1976, 507-522
145. MAZUR, P. und R.H. MILLER (1976)
Survival of frozen-thawed human red cells as a function
of the permeation of Glycerol and Sucrose
Cryobiology, 13, 1976, 523-536
146. MCGANN, L.E. (1978)
Differing actions of penetrating and non-penetrating
cryoprotective agents
Cryobiology, 15, 1978, 382-390
147. MCGRATH, J.J., E.G. CRAVALHO und C.E. HUGGINS (1975)
An experimental comparison of intracellular ice formation
and freeze-thaw survival of HeLa S-3 cells
Cryobiology, 12, 1975, 540-550
148. MERYMAN, H.T. (1968)
Modified model for the mechanism of freezing injury in
erythrocytes
Nature, 218, 1968, 333-336
149. MERYMAN, H.T. (1970)
Cryoprotective agents
Cryobiology, 6, 1970, 592 (Abstr.)
150. MERYMAN, H.T. (1971)
Absence of unfrozen freezable water in rapidly frozen
red cells
Cryobiology, 7, 1971, 252-255
151. MERYMAN, H.T. (1974)
Freezing injury and its prevention in living cells
Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. 3
Palo Alto, 1974, 341-363
152. MERYMAN, H.T., R.J. WILLIAMS und M.S.J. DOUGLAS (1977)
Freezing injury from "solution effects" and its pre-
vention by natural or arteficial cryoprotection
Cryobiology, 14, 1977, 287-302

153. MILLER, R.H. und P. MAZUR (1976)
Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities
Cryobiology, 13, 1976, 404-414
154. MIYAMOTO, H. und T. ISHIBASHI (1976)
Factors involved in the survival of mouse eight-cell and morula embryos frozen to -196°C
Jap. J. Zootechnical Sci., 47, 1976, 23-28
155. MIYAMOTO, H. und T. ISHIBASHI (1977)
Survival of frozen-thawed rat embryos in the presence of Ethylen Glycol
J. Reprod. Fert., 50, 1977, 373-375
156. MIYAMOTO, H. und T. ISHIBASHI (1981)
Effects of the temperature of ice-seeding on survival of frozen-and-thawed mouse embryos
Experientia, 37, 1981, 187-188
157. MOORE, N.W. und R.J. BILTON (1977)
Frozen storage of embryos of farm animals: progress and implication
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 203-220
158. MOORE, R., N. DAVIS und R. BERGER (1970)
Description of a model of water transport from a cell during freezing
Cryobiology, 6, 1970, 277 (Abstr.)
159. MORRIS, G. (1982)
The response of liposomes to various rates of cooling to -196°C : Effect of phospholipid : cholesterol ratio
Cryobiology, 19, 1982, 215-218
160. NIEMANN, H. (1980)
Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Entwicklungsfähigkeit früher Embryonalstadien von Kaninchen und Rind mit dem FDA- und DAPI- Test
Tierärztl. Hochschule Hannover, 1980, Diss.

161. NIEMANN, H., B. SACHER, E. SCHILLING und D. SMIDT (1982)
Die Entwicklungsfähigkeit von aufgetauten Rinderembryonen
in Abhängigkeit von der Qualität nach schnellem
Tiefgefrieren und Auftauen
Verhandlungsbericht VII. Veterinär-Humanmedizinische
Tagung, Gießen 18.-20.Feb.1982, S. 54-56
162. OGAWA, S. und S. TOMODA (1976)
Survival of 16-celled and morula stage rabbit embryos
frozen to -196°C
Exp.Anim.,25(4),1976,273-282
163. OSTASHKO, F.J. und M.K. DIBIROV (1980)
Structure and permeability of the cytoplasmatic membrane
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980,2,293
164. PARKENING, T.A. und M.C. CHANG (1977)
Effects of cooling rates and maturity of the animal on
the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent
eggs
Biology of Reproduction,17,1977,527-531
165. PARKES, A.S. (1951)
zitiert nach LOVELOCK (siehe 115)
Proc. Soc. Study of Fertility,2,1951,12
166. PARVEX, R., J.P. RENARD und J.P. OZILL (1980)
Viability of rabbit embryos after freezing in liquid
nitrogen
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980,2,464 (Abstr.)
167. POKORNY, R. (1981)
Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Rinderembryonen
mit Hilfe der Tiefgefrieranlage Modell Neustadt/Aisch
Tierärztl. Hochschule Hannover, 1981, Diss.
168. POLGE, C. (1977)
The freezing of mammalian embryos: perspectives and
possibilities
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 3-18

169. POLGE, C., A.U. SMITH und A.S. PARKES (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and de-
hydratation at low temperature
Nature, 164, 1949, 666
170. POLGE, C., J. WILMUT und L.E.A. ROWSON (1974)
The low temperature preservation of cow, sheep and pig
embryos
Cryobiology, 11, 1974, 560 (Abstr.)
171. POLGE, C. und S.M. WILLADSEN (1978)
Freezing eggs and embryos of farm animals
Cryobiology, 1, 1978, 370-373
172. POUGET, F.A. (1866)
Recherches experimentales sur la congelation des animaux
J. Anat. Physiol., 3, 1866, 1-36 (zitiert nach LUYET)
173. RAJOTTE, R.V., D. SCHARP, R. DOWNING, R. PRESTON,
G.D. NOLAR, W.F. BALLINGER, M.H. GEIDER (1981)
Pancreatic islet banking: the transplantation of frozen-
thawed rat islets transported between centers
Cryobiology, 18, 1981, 357-369
174. RALL, W.F., P. MAZUR und S. HIROHI (1978)
Physical-chemical basis of the protection of slowly
frozen human erythrocytes by Glycerol
Biophysical Journal, 23, 1978, 101-120
175. RALL, W.F. und J. FARRANT (1979)
Slow warming injury to mouse embryos: dissociation
between the formation of intracellular ice and injury
Cryobiology, 16, 1979, 589 (Abstr.)
176. RALL, W.F., D.S. REID und J. FARRANT (1980)
Innocuous biological freezing during warming
Nature, 286, 1980, 511-514
177. RAPATZ, G., J.J. SULLIVAN und B. LUYET (1968)
Preservation of erythrocytes in blood containing various
cryoprotective agents, frozen at various rates and
brought to a given final temperature
Cryobiology, 5, 1968, 18-25

178. RASMUSEN, D.H. und A.P. MACKENZIE (1968)
A phase diagram for the water-Dimethyl-Sulphoxide system
Cryobiology, 4, 1968, 248 (Abstr.)
179. ROBERTIS, E.D.P., W.W. NOWINSKI und F.A. SAFAZ (1965)
Cell biology
Philadelphia, London, Saunders Comp., 1965
180. SCHILLING, E. und H.H. DÖPKE (1978)
A rapid diagnostic test for the viability of early cattle
and rabbit embryos using diacetyl-fluorescein
Naturwissenschaften, 65, 1978, 658
181. SCHILLING, E., H. NIEMANN und S.F. CHENG (1980)
Evaluation of deep frozen cattle embryos
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980, 2, 463
182. SCHNEIDER, M.G. (1981)
Fluide Mischungen bei hohen Drücken
Opladen, Westdeutscher Verlag, 1981
183. SCHNEIDER, U.J., J. HAHN und H. SULZER (1974)
Erste Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung von Mäuse-
und Kanincheneizellen
Dt. Tierärztl. Wochenschr., 81, 1974, 470-472
184. SCHNEIDER, U.J., J. HAHN, A. GÖRLACH, R. ROSELIUS (1980)
Survival rates of frozen embryos after various thawing
procedures
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980, 2, 452
185. SHEA, B.F., G.W. OLLIS, D.J. HINES, D.E. LIGHTFOOD,
S.M. OLSON (1976)
The transfer of bovine embryos
in: ROWSON, L.E.A. (Hrsg.): Egg transfer in cattle,
EEC-Seminar, Cambridge, Comm. of europ. comm., EUR 5491,
S. 145-152
186. SHERMAN, J.K. (1963)
Questionable protection by intracellular Glycerol during
freezing and thawing
J. Cell. Comp. Physiol., 61, 1963, 67-80

187. SHERMAN, J.K. und T.P. LIN (1958)
Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 1958, 902-905
188. SHERMAN, J.K. und T.P. LIN (1958)
Effect of Glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs
Nature, 181, 1958, 785-786
189. SMITH, A.U. (1950)
Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-cells
Lancet, 2, 1950, 910-911
190. SMITH, A.U. (1952)
Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to Glycerol and to low temperatures
Nature, 170, 1952, 374-375
191. SMITH, A.U., C. POLGE und J. SMILES (1951)
Microscopic observations of living cells during freezing and thawing
J. Roy. Microscopic. Soc., 71, 1951, 186
192. SMORAG, Z., L. KATSKA und S. WIERZBOWSKI (1976)
WPL YW Tempperatury Posiewania na Prezywanie Zamrozonnych embrionow Myszy
(Influence of seeding temperature on the viability of frozen mouse embryos)
Rocz. nank. Zoot. T.3.z.2, 1976, 21-30
193. TROTNOW, S., T. HÜNLICH und T. KNI EWALD (1980)
Successful cryopreservation and transplantation of mouse embryos
Arch. Andrology, Suppl., 1980, A146 (Abstr.)
194. TROTNOW, S., S. AL HASANI und C. SADTLER (1981)
Experience with in vitro fertilization of follicular rabbit oocytes and embryo transfer
Arch. Gynecol., 231, 1981, 41-50

195. TROTNOW, S., B. SZILVASSY, A. GÖRLACH und R. HAHN (1982)
Eine neue Gefriertechnik für Präimplantationsembryonen
Zuchthyg., 17, 1982, 159-164
196. TROUNSON, A.O., S.M. WILLADSEN und L.E.A. ROWSON (1976)
The influence of in vitro culture and cooling on the
survival and development of cow embryos
J. Reprod. Fert., 47, 1976, 367-370
197. TROUNSON, A.O., B.F. SHEA, G.W. OLLIS, M.E. JACOBSON
(1978)
Frozen storage and transfer of bovine embryos
J. Animal Sci., 47, 1978, 677-681
198. TSUNODA, Y., T.A. PARKENING und M.C. CHANG (1976)
In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after
freezing and thawing
Experientia, 32, 1976, 223-224
199. TSUNODA, Y. und T. SUGIE (1977)
Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in
liquid nitrogen
J. Reprod. Fert., 49, 1977, 173-174
200. TSUNODA, Y. und T. SUGIE (1977)
Effect of the freezing medium on the survival of rabbit
eggs after deep freezing
J. Reprod. Fert., 50, 1977, 123-124
197. TROUNSON, A.O., B.F. SHEA, G.W. OLLIS, M.E. JACOBSON
(1978)
Frozen storage and transfer of bovine embryos
J. Animal Sci., 47, 1978, 677-681
198. TSUNODA, Y., T.A. PARKENING und M.C. CHANG (1976)
In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after
freezing and thawing
Experientia, 32, 1976, 223-224
201. TUFT, P.H., H. BÖWING und G. BEUT (1970)
The forces involved in water uptake by the rabbit
blastocyst
J. Exp. Zool., 174(2), 1970, 165-172

202. UTSUMI, K. (1978)
Factores affecting survival of frozen embryo with
special reference to cooling rate
Cryobiology, 15, 1978, 687-688 (Abstr.)
203. UTSUMI, K., M. YUHARA und M. YAMADA (1978)
Viability of frozen two cell eggs and blastocysta in rat
Cryobiology, 15, 1978, 689 (Abstr.)
204. WALES, R.G. (1970)
Effects of ions on the development of the pre-
implantation mouse embryo in vitro
Aust. J. Biol. Sci., 23, 1970, 421-429
205. WALES, R.G. und D.G. WHITTINGHAM (1971)
Decomposition of sodium pyruvate in culture media
stored at 5°C and its effects on the development
of the pre-implantation mouse embryo
J. Reprod. Fert., 24, 1971, 126 (Abstr.)
206. WAYMOUTH, C. (1970)
Osmolality of mammalian blood and of media for culture
of mammalian cells
In Vitro, 6, 1970, 109-127
207. WEISSMANTEL, C. und C. HAMAN (1979)
Grundlagen der Festkörperphysik
Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1979
208. WHITTINGHAM, D.G. (1968)
Fertilization of mouse eggs in vitro
Nature, 220, 1968, 592-593
209. WHITTINGHAM, D.G. (1971)
Survival of mouse embryos after freezing and thawing
Nature, 233, 1971, 125-126
210. WHITTINGHAM, D.G. (1971)
Culture of mouse ova
J. Reprod. Fert., 14, 1971, 7-21

211. WHITTINGHAM, D.G. (1974)
The viability of frozen-thawed mouse blastocysts
J. Reprod. Fert., 37, 1974, 159-162
212. WHITTINGHAM, D.G. (1975)
Survival of rat embryos after freezing and thawing
J. Reprod. Fert., 43, 1975, 575-578
213. WHITTINGHAM, D.G. (1976)
Low temperature storage of mammalian embryos
in: MÜHLBOCK, O. (Hrsg.): Proc. of the workshop on basic
aspects of freeze preservation of mouse strains
Stuttgart, Fischer Verlag, 1976, S. 45-55
214. WHITTINGHAM, D.G. (1977)
Fertilization in vitro and development to term of
unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C
J. Reprod. Fert., 49, 1977, 89-94
215. WHITTINGHAM, D.G. (1977)
Some factors affecting embryo storage in laboratory
animals
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 97-110
216. WHITTINGHAM, D.G. (1978)
Viability assays for mammalian ova
Cryobiology, 15, 1978, 245-248
217. WHITTINGHAM, D.G. (1980)
Preservation of embryos of the laboratory animals
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980, 2, 237-243
218. WHITTINGHAM, D.G. und J.D. BIGGERS (1967)
Fallopian tube and early cleavage in the mouse
Nature, 213, 1967, 924-925 (Abstr.)
219. WHITTINGHAM, D.G. und R.G. WALES (1969)
Storage of two-cell mouse embryos in vitro
Aust. J. Biol. Sci., 22, 1969, 1065-1068

220. WHITTINGHAM, D.G., S.P. LEIBO und P. MAZUR (1972)
Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C
Science, 178, 1972, 411-414
221. WHITTINGHAM, D.G. und C.E. ADAMS (1974)
Low temperature preservation of rabbit embryos
Cryobiology, 11, 1974, 560 (Abstr.)
222. WHITTINGHAM, D.G. und W.K. WHITTEN (1974)
Long-term storage and aerial transport of frozen mouse embryos
J. Reprod. Fert., 36, 1974, 433-435
223. WHITTINGHAM, D.G. und E. ANDERSON (1976)
Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos
J. Reprod. Fert., 48, 1976, 137-140
224. WHITTINGHAM, D.G. und C.E. ADAMS (1976)
Low temperature preservation of rabbit embryos
J. Reprod. Fert., 47, 1976, 269-274
225. WHITTINGHAM, D.G., M.F. LYON und P.H. GLENISTER (1977)
Long-term storage of mouse embryos at -196°C .
The effect of background radiation
Genet. Res., 29, 1977a, 171-181
226. WHITTINGHAM, D.G., M. WOOD, J. FARRANT, H. LEE,
J.A. HALESY (1979)
Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing
from -196°C
J. Reprod. Fert., 56, 1979, 11-21
227. WILLADSEN, S.M. (1977)
Factores affecting the survival of sheep-embryos
during deep-freezing and thawing
in: ELLIOTT, K. und J. WHEALAN (Hrsgg.) : The freezing of
mammalian embryos, Ciba Foundation Symp. No. 52 (new
series) Amsterdam, Elsevier North-Holland, 1977, S. 175-202
228. WILLADSEN, S.M. (1980)
Deep freezing of embryos in the large domestic species
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.
Madrid 1980, 2, 255-261

229. WILLADSEN, S.M., C. POLGE, L.E.A. ROWSON, R.M. MOORE
(1974)
Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen
Cryobiology, 11, 1974, 560 (Abstr.)
230. WILLIAMS, R.J. (1981)
Membrane injury during osmotic cell dehydration
Cryobiology, 18, 1981, 613 (Abstr.)
231. WILLIAMS, R.J. und T. TAKAHASHI (1979)
Microscopic observation of human red cells undergoing
thermal shock
Cryobiology, 16, 1979, 589 (Abstr.)
232. WILLIAMS, R.J. und S.K. SHAW (1980)
The relationship between cell injury and osmotic volume
reduction: II. Red cell lysis correlates with cell volume
rather than intracellular salt concentration
Cryobiology, 17, 1980, 530-539
233. WILMUT, I. (1972)
The effect of cooling rate, cryoprotective agent, and
stage of development on survival of mouse embryos during
freezing and thawing
Life Sciences, 11-2, 1972, 1071-1079
234. WILMUT, I. (1972)
The low temperature preservation of mammalian embryos
J. Reprod. Fert., 31, 1972, 513-514
235. WILMUT, I. und L.E.A. ROWSON (1973)
Experiments on the low-temperature preservation of cow
embryos
The Veterinary Record, 92, 1973, 686-690
236. WILMUT, I. und L.E.A. ROWSON (1973)
The successful low-temperature preservation of mouse and
cow
J. Reprod. Fert., 33, 1973, 352-353
237. WILMUT, I., C. POLGE und L.E.A. ROWSON (1975)
The effect on cow embryos of cooling to 20.0 and -196°C
J. Reprod. Fert., 45, 1975, 409-411

235. WILMUT, I. und L.E.A. ROWSON (1973)
Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos
The Veterinary Record, 92, 1973, 686-690
236. WILMUT, I. und L.E.A. ROWSON (1973)
The successful low-temperature preservation of mouse and cow
J. Reprod. Fert., 33, 1973, 352-353
237. WILMUT, I., C. POLGE und L.E.A. ROWSON (1975)
The effect on cow embryos of cooling to 20.0 and -196°C
J. Reprod. Fert., 45, 1975, 409-411
238. WOOD, M. und J. FARRANT (1980)
Preservation of mouse embryos by two-step freezing
Cryobiology, 17, 1980, 178-180
239. WOOLGAR, A.E. (1974)
Hemolysis of human red blood cells by freezing and thawing in solutions containing sucrose: relationship with posthypertonic hemolysis and solute movements
Cryobiology, 11, 1974, 44-51
240. WOOLGAR, A.E. und G.J. MORRIS (1973)
Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic hemolysis of human red blood cells
Cryobiology, 10, 1973, 82-83
241. YOSHIKUNI, O. und E. ASAHIA (1972)
Supercooling injury in the egg cell of the sea urchin
Cryobiology, 9, 1972, 22-28
242. YUHARA, M., K. NISHIMURA und K. UTSUMI (1978)
Viability of frozen rabbit embryos with reference to egg stage and rabbit strain
Cryobiology, 15, 1978, 689-690 (Abstr.)

Herrn Professor Dr.med. S. Trotnow danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, besonders aber für die stets großzügig gewährte Unterstützung und die Möglichkeit, die Untersuchungen selbständig planen und durchführen zu können.

Mein Dank gilt auch Frau Diplom Biologin T. Kniewald für ihre Mithilfe bei der Durchführung der Versuche und Herrn Dr.med. vet. S. Al Hasani für seine große Hilfsbereitschaft und seine Ratschläge.

Herrn Dr.ing. F. Dittrich und Herrn Dr.ing. C. Wurmthaler vom Institut für Regelungstechnik der Universität Erlangen Nürnberg (Vorstand:Prof.Dr. Schlitt) danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung und Beratung in technischen Fragen .

Herrn Dr. Prestele danke ich für seine Beratung in statistischen Fragen.

Nur durch das hohe persönliche Engagement von Herrn Nowecki bei der Pflege der Versuchstiere konnten die Versuche zügig durchgeführt werden.

Frau Sosnitza möchte ich nicht zuletzt für ihre Hilfe beim Erstellen der Abbildungen danken.

Lebenslauf

Am 4. Oktober 1956 wurde ich als erstes von drei Kindern des Arbeitsberaters Franz Siebzehnriibl und seiner Frau Rosa, geb. Rudolf in Passau geboren. Von 1963 bis 1968 besuchte ich die Volksschule Passau-Auerbach, danach bis 1977 das Adalbert - Stifter - Gymnasium in Passau, wo ich 1977 auch das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1977 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Regensburg, wo ich im August 1979 die Ärztliche Vorprüfung ablegte, um anschließend an die Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zu wechseln. Im November 1983 schloß ich mein Studium mit der Ärztlichen Prüfung ab und erhielt kurz darauf die Approbation als Arzt. 1978 schloß ich die Ehe mit meiner Frau Christine, geb. Öller, im selben Jahr wurde unser Sohn Florian geboren.

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen